

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

JANE PARISENTI

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DA RAÇÃO COM
Haematococcus pluvialis E LECITINA DE SOJA NA
PIGMENTAÇÃO DO CAMARÃO.**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Ciência dos Alimentos.
Orientador: Luiz Henrique Beirão
Co-orientadora: Vera Lúcia Cardoso
Garcia Tramonte

Florianópolis
2011

Ficha catalografica
Imprimir aqui arquivo a parte

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DA RAÇÃO COM
Haematococcus pluvialis E LECITINA DE SOJA NA
PIGMENTAÇÃO DO CAMARÃO.

Por
Jane Parisenti

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor
em Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina,
pela banca examinadora:

Presidente: _____

Prof. Dr. Luiz

Não imprimir esta
folha. Esperar para
encadernar com folha
original.

(Orientador)

Membro: _____

Prof. Dr. Milton Luiz Espírito Santo

Membro: _____

Prof. Dr. Marcos Luiz Pessatti

Membro: _____

Prof. Dra. *Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte* (UFSC)

Membro: _____

Prof. Dr César Damian

Coordenadora: _____

Roseane Fett

Florianópolis, maio de 2011.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao orientador, Luiz Henrique Beirão pela confiança, oportunidade e tranquilidade transmitida durante o percurso.

A minha coorientadora Prof^{ra} Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte, eterna orientadora, fazendo parte de toda minha formação acadêmica.

Aos Profs. Marcelo Maraschin, Roberto B. Derner, Roseane Fett, Daniel Barrera-Arellano, Edson Luiz da Silva, Sandra R. P. Avancini e César Damian. Com o apoio de mestres como vocês o caminho tornou-se possível.

A todos do Laboratório de Nutrição Experimental Fabiana Ouriques, Camila C. Britto, Caroline C. Moreira, Gerson L. Faccin;

A todos do Laboratório de Química dos Alimentos Ismael Rockenback, Luana Bedin e especialmente a Luciano Gonzaga.

A todos do Laboratório de Camarões Marinhos, especialmente ao José Luiz Mouriño, Felipe Vieira e Celso Buglione;

Aos pós-graduandos Ronaldo Lima, Manuela Vieira, Rossana Podestá, Priscilla Lemos e especialmente a Eliseu Rodrigues pelo auxílio fundamental nas análises e estatística.

A amiga Cristiane Manfé Pagliosa, sempre juntas nos desafios e conquistas acadêmicas.

À CAPES, pela bolsa de estudos;

A minha família por acreditar e incentivar meus estudos durante tantos anos.

A meu marido Andrey Pozzobom Martins, por toda compreensão, força emocional e física desprendida para que eu nunca desistisse.

A minha filha Giulia que já antes do seu nascimento divide a mãe com computadores, ostras, camarões e artigos. Tudo será recompensado.

RESUMO

Os camarões são muito apreciados pela população devido às suas características sensoriais, sendo a coloração vermelho-alaranjada um dos aspectos mais importantes para sua aceitabilidade. O principal pigmento responsável por esta coloração é a astaxantina, um carotenóide presente na cadeia trófica de camarões selvagens e que pode ser incluída nas rações para camarões de cultivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição de lecitina de soja sobre a absorção e deposição de carotenóides nos camarões alimentados com ração suplementada com *Haematococcus pluvialis* (Hp) como fonte de carotenóides, e avaliar a preferência dos consumidores com relação à coloração dos camarões. Os camarões (*Litopenaeus vannamei*) foram divididos em 12 tanques com 90 camarões cada. Aleatoriamente, os tanques foram divididos em quatro grupos e alimentados com ração controle, suplementada com lecitina de soja (Lec. 2%), suplementada com 60 ppm de carotenóides (Hp) e suplementada com lecitina/Hp. Foram realizadas análise de carotenóides totais (espectrofotômetro), astaxantina (Cromatografia líquida de alta eficiência), cor (colorímetro, sistema CIELab) e análise sensorial (ordenação de preferência). Os grupos Hp e Lec/Hp apresentaram maior teor de carotenóides totais no músculo e exoesqueleto que os grupos controle e lecitina. Os camarões frescos dos grupos Hp e Lec/Hp apresentaram-se mais avermelhados/alaranjados (maior valor de a^* e h mais próximo de 90°) que o controle e Lec. Com o cozimento, os grupos Hp e Lec/Hp apresentaram-se mais avermelhados (maiores valores de a^* , menores valores de h e menor valor de L^*), que os grupos controle e Lec mais amarelados (h mais próximo de 90°) e mais claros (L^* maior). A análise de preferência mostrou que os consumidores preferem os camarões mais claros quando frescos e mais alaranjados quando cozidos. Estes resultados apontam um desafio para indústria de camarões, já que os camarões mais claros quando frescos são menos laranja após o cozimento. Os resultados mostram que a adição de lecitina de soja não causou efeito sobre o aproveitamento dos carotenóides pelos camarões. A adição de 60 ppm de carotenóides de *H. pluvialis* aumentou o teor deste composto nos camarões e melhorou a aceitabilidade dos camarões cozidos.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, astaxantina, carotenóides, fosfolipídios, coloração, ordenação de preferência.

ABSTRACT

Shrimp is enjoyed widely by the general public due to its sensory features, being its reddish-orange color one of the most important features for its acceptability. Astaxanthin is the main pigment responsible for such color – a carotenoid present in the trophic cascade of wild shrimp which can be included in farmed shrimp food. The objective of this paper was to evaluate the effects of soy lecithin on the absorption and deposition of carotenoid on shrimp fed with *Haematococcus pluvialis*-supplemented food, and to evaluate customer preference as regards to shrimp color. Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was divided in 12 tanks with 90 shrimp each. The tanks were randomly divided into four groups fed with control feed, feed supplemented with soy lecithin (Lec. 2%), food supplemented with 60ppm of *Haematococcus pluvialis* (Hp) carotenoids, and food supplemented with lecithin and *Haematococcus pluvialis* (Lec/Hp). Total carotenoid analyses (via spectrophotometer), astaxanthin (via HPLC), color (via colorimeter under the CIELab system), and sensorial analyses (through preference order) have been performed. The Hp and Lec/Hp groups presented a higher amount of total carotenoids in muscle and exoskeleton than the control and Lec groups. Fresh, shrimp of the Hp and Lec/Hp groups presented a stronger reddish-orange color (higher a^* and h closer to 90°) than the control and Lec groups. After cooking, Hp and Lec/Hp groups presented a more reddish shade (higher a^* , lower h , and lower L^*) than the control and Lec groups which are of a yellow (h closer to 90°), lighter shade (higher L^*). The shrimp preference ranking showed that consumers prefer lighter fresh shrimp and brightly orange cooked shrimp. Such results present a challenge to be conquered by the shrimp industry, since lighter fresh shrimp is not so brightly orange-colored after cooking. Results also show that soy lecithin was not effective on the carotenoid absorption of shrimp. The addition of 60ppm of *H. pluvialis* carotenoids for 28 days has enhanced the amount of astaxanthin carotenoid in shrimp, improving its acceptability when cooked.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, astaxanthin, carotenoids, phospholipids, color, preference-ranking test.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Estrutura da astaxantina	28
Figura 2	Camarão <i>in natura</i> (a) e após cozimento (b), efeito batocrômico	32

CAPÍTULO 2

Figura 1 (2.1)	Fresh and cooked shrimp fed control (a), <i>Haematococcus pluvialis</i> (<i>H. pluvialis</i>) (b), and lecithin/ <i>H. pluvialis</i> (c) diets	60
Figura 1 (2.2)	Camarões fresh e cozidos alimentados com ração Controle (1), Lec (2), Hp (3) e Lec/Hp (4), por 28 dias	78

CAPÍTULO 3

Figura 1 (3.1)	Raw and cooking shrimp utilized in preference-ranking test (Cooked shrimps (a): 581 light orange, 299 orange, 789 intense orange; Raw shrimps (b): 232 light gray, 325 gray, 598 dark gray)	95
Figura 1 (3.2)	Cooked shrimp utilized in sensorial test (832 highest total carotenoids shrimp and, 425 lowest total carotenoids shrimp)	106

CAPÍTULO 4

Figura 1	Fresh and cooked shrimps grown in white (a) and black (b) tanks	117
----------	---	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

2.1 Pigmentação e conteúdo de carotenóides de camarão alimentado com *Haematococcus pluvialis* e lecitina de soja

Table 1	Composition of experimental diets	56
Table 2	Final weight (g) and survival (%) of shrimp fed control, <i>Haematococcus pluvialis</i> (<i>H. pluvialis</i>), and lecithin/ <i>H. pluvialis</i> diets	58
Table 3	Color parameters of shrimp fed control, <i>Haematococcus pluvialis</i> (<i>H. pluvialis</i>), and lecithin/ <i>H. pluvialis</i> diets	59
Table 4	Total carotenoid and astaxanthin (mg kg ⁻¹) content in shrimp (muscle and exoskeleton) fed control, <i>Haematococcus pluvialis</i> (<i>H. pluvialis</i>) and lecithin/ <i>H. pluvialis</i> diets.	61
Table 5	Pearson's correlation coefficients of total carotenoids/astaxanthin and color parameters of shrimp	63

2.2 Pigmentação, teor de astaxantina e preferência de camarões alimentados com *Haematococcus pluvialis* e lecitina de soja

Tabela 1	Composição das rações experimentais	70
Tabela 2	Ganho de peso (g) de camarões alimentados com ração controle, Lec, Hp e Lec/Hp por 14 e 28 dias de experimento	73
Tabela 3	Carotenóides totais e astaxantina (mg kg ⁻¹) de camarões (músculo e exoesqueleto) alimentados com ração controle, Lec, Hp e Lec/Hp por 14 e 28 dias	76
Tabela 4	Parâmetros de cor de camarões <i>in natura</i> e cozidos alimentados com ração controle, Lec, Hp e Lec/Hp por 14 e 28 dias	79
Tabela 5	Distribuição dos escores (%) de acordo com a preferência dos consumidores (n=30) com relação à cor dos camarões cozidos	81

CAPÍTULO 3

3.1 Preferência dos consumidores com relação à coloração de camarões crus e cozidos

Table 1	L*, a*, b*, h and C* color parameters from shrimp preference analyses	95
Table 2	Distribution of scores (%) according to the preference of consumers (n=35) in the sensory analysis of shrimp color	97

3.2 Teor de carotenóides totais de camarões comercializados em Florianópolis/SC e preferência de coloração por consumidores

Table 1	Total carotenoids (mg %) and color parameters L*, a*, e b* for samples and shrimps from analyzes of preference.	107
---------	---	-----

CAPÍTULO 4

Table 1	L*, a* and b* values for samples of muscle and cephalothorax of raw and cooked shrimps grown in black and white tanks	118
Table 2	Carotenoids content (mg/100 g) in muscle and cephalothorax of shrimps kept in black and white tanks	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
g	Gramma
<i>H. pluvialis</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>
Hp	<i>Haematococcus pluvialis</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
LCM	Laboratório de Camarões Marinhos
Lec.	Lecitina
Lec/Hp	Lecitina/ <i>Haematococcus pluvialis</i>
<i>L. vannamei</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>
mg	Miligramma
mg%	Miligramma por 100 grammas
mg/100g	Miligramma por 100 grammas
mg/kg	Miligramma por quilo
mL	Mililitro
mm	Milímetros
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetros
ppm	Partícula por milhão
SD	Standard deviation
t	Tonelada
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
μl	Microlitro
L*	Luminosidade
a*	Gama de cor (verde ao vermelho)
b*	Gama de cor (azul ao amarelo)
h	Ângulo hue

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
1.1 Produção de camarões	25
1.2 Astaxantina	28
1.3 Propriedades biológicas da astaxantina	30
1.3.1 Funções biológicas da astaxantina no camarão	31
1.3.2 Nutrição e saúde	34
1.4 Lecitina na ração de camarões	36
1.5 Importância comercial da coloração dos camarões	38
2 Referências	39
 CAPÍTULO 2 – EFEITO DA LECITINA DE SOJA SOBRE A PIGMENTAÇÃO DE CAMARÕES ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM <i>Haematococcus pluvialis</i>	 53
2.1 Pigmentação e conteúdo de carotenóides de camarão alimentado com <i>Haematococcus pluvialis</i> e lecitina de soja	53
Abstract	53
Introduction	54
Material and methods	55
Results and discussion	58
References	64
2.2 Pigmentação e teor de astaxantina de camarões alimentados com <i>Haematococcus pluvialis</i> e lecitina de soja e preferência de cor dos consumidores	68
Introdução	68
Material e métodos	69
Resultados e discussão	73
Conclusões	82
Referências	83
Considerações importantes	89

CAPÍTULO 3 – PREFERÊNCIA DOS CONSUMIDORES COM RELAÇÃO À COLORAÇÃO DE CAMARÕES 91

3.1 Preferência dos consumidores com relação à coloração de camarões crus e cozidos	91
Abstract	91
Introduction	92
Materials and methods	93
Results and discussion	94
References	99
3.2 Teor de carotenóides totais de camarões comercializados em Florianópolis/SC e preferência de coloração por consumidores	103
Abstract	103
Resumo	104
Introduction	104
Material and methods	105
Results	106
Discussion	107
References	108

CAPITULO 4 – EFEITO DA COR DO TANQUE DE CULTIVO SOBRE A PIGMENTAÇÃO DE CAMARÕES

<i>Litopenaeus vannamei</i>	113
Abstract	113
Resumo	114
Introduction	114
Materials and Methods	115
Results and Discussion	116
References	120

CONSIDERAÇÕES FINAIS 125

INTRODUÇÃO

Os camarões são muito apreciados pela população devido às suas características sensoriais e valor nutritivo. Embora a composição nutricional varie conforme a espécie e fatores ambientais, de maneira geral os camarões são fontes de proteínas de alto valor biológico e diversos minerais. Além disso, possuem propriedades tecnológicas que permitem sua utilização em diferentes formulações industriais (OGUNLADE et al., 2005).

Um dos aspectos mais importantes para aceitabilidade do camarão pelos consumidores é sua coloração vermelho-alaranjada que é associada a frescor e qualidade do produto. O principal pigmento responsável por esta coloração é a astaxantina, um carotenóide também presente nos salmonídeos (BOONYARATPALIN et al., 2001).

Os camarões nativos adquirem os carotenóides pelo consumo de microalgas e de outros pequenos crustáceos presentes no ambiente, enquanto que para os camarões de cultivo estes devem ser adicionados na ração, já que os animais não sintetizam carotenóides. Vários estudos apontam a astaxantina como o pigmento mais efetivo na coloração de camarões além de melhorar o desenvolvimento, reprodução e desova dos camarões (YAMADA et al., 1990; BOONYARATPALIN et al., 2001; ARREDONDO-FIGUEROA et al., 2003), sendo a microalga *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) a principal fonte natural de astaxantina (NOBRE et al., 2006).

A quantidade de astaxantina necessária para o camarão bem como o tempo de tratamento e os fatores que interferem em sua absorção não estão determinados. A adição da quantidade mínima necessária para o bom desenvolvimento e coloração pode contribuir para diminuição do custo de produção, já que o excesso não é absorvido ou é posteriormente excretado ou catabolizado (CHIEN; JENG, 1992).

A influência da lecitina de soja nas rações para camarões foi investigada em vários estudos demonstrando melhores resultados em termos de sobrevivência, crescimento, metabolismo lipídico e resistência ao estresse (COUTTEAU et al., 1997; GONG et al., 2000a,b; GONZÁLEZ-FÉLIX et al., 2002a,b), mas sua relação com a astaxantina não foi avaliada. Segundo Gong et al. (2000b) a fosfatidilcolina (principal fosfolípido encontrado na lecitina) facilita a mobilização e transporte dos lipídios do hepatopâncreas até os músculos, através a hemolinfa. Em truta salmonada, Takahashi et al. (2008) conseguiram um aumento de 15 a 20% na concentração de astaxantina no músculo

através da adição de lecitina de soja na ração suplementada com astaxantina.

Em relação ao consumo de astaxantina por humanos, vários estudos demonstram seus efeitos benéficos devido às suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias. Estudos tem comprovado efeitos benéficos da astaxantina em casos de câncer, doenças oculares, coronarianas, da pele e neurodegenerativas, protetor dos raios ultravioleta, das funções hepáticas e atividade imunológica (GUERIN et al., 2003; HUSSEIN et al., 2006; CREMADES et al., 2007), além do efeito protetor contra oxidação do colesterol e ácidos graxos polinsaturados essenciais (PALLOZA, 2008; MCNULTY et al., 2008).

As fontes alimentares de astaxantina são restritas a alguns tipos de truta, salmão, mexilhão, camarão e suplementos alimentares (ainda não liberados no Brasil). Destaca-se o consumo de camarão por apresentar elevado valor nutricional, disponibilidade em diversas regiões e importância econômica para o país.

Em vista dos benefícios da astaxantina para o camarão e para o homem e da preferência dos consumidores por camarões com coloração mais intensa, o desenvolvimento de estratégias para produção de camarões com maior teor de astaxantina, em especial sem alterar significativamente o custo de produção, constitui um importante fator na produção de alimentos mais nutritivos, atrativos e com maior valor agregado ao produto final.

Portanto, considerando os efeitos da suplementação com carotenóides sobre a coloração dos camarões, o objetivo deste estudo foi investigar se a adição de lecitina de soja aumenta a deposição destes compostos nos camarões *Litopenaeus vannamei* e avaliar a preferência dos consumidores com relação a esta coloração.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Produção de camarões

A aquicultura mundial é fortemente dominada pela Ásia, responsável por 88% da produção mundial, sendo a China seu maior representante. A região também é a maior produtora de camarões, responsável por 88% da produção (FAO, 2009).

Os camarões representaram mais de 15% do valor total dos produtos da pesca comercializados mundialmente em 2008, sendo o mais importante produto aquícula em termos de valor (FAO, 2010).

Com a redução dos estoques naturais de camarões e a crescente demanda pelo produto, aumenta a necessidade da produção em cativeiro. Atualmente 70% dos camarões consumidos no mundo provem de fazendas de cultivo (FAO, 2009).

Com o aumento das fazendas de cultivo de camarões, a espécie *Litopenaeus vannamei* (*L. vannamei*) tornou-se a espécie aquática com maior representatividade econômica na aquicultura mundial (9 bilhões de dólares, em 2008) (FAO, 2010). No Brasil, é praticamente a única espécie cultivada (ROCHA, 2007).

Embora a aquicultura apresente excelente taxa de crescimento mundial, ela não se desenvolve de maneira igual nos diferentes países. Nos países desenvolvidos, com melhor infra-estrutura, o desenvolvimento da aquíicultura é muito mais rápido que em países em desenvolvimento ou de economias pobres, onde faltam investimentos e políticas de apoio (FAO, 2009).

No Brasil, a produção da aquíicultura marinha apresentou um grande incremento em 2004, sendo impulsionada especialmente pelos camarões na região Nordeste e das ostras na região Sul. Entre 1996 e 2004 os crustáceos apresentaram um aumento na produção de 1881%, sendo o camarão responsável por 99,5% deste incremento (OSTRENSKY et al., 2008). Em 2004 o Ceará foi o principal produtor aquícola nacional, seguido por Santa Catarina (ROCHA, 2007).

A carcinicultura brasileira passou por momentos de crescimento intercalados com períodos de grandes perdas da produção. Entre os anos de 1984 e 1987, as fortes chuvas no nordeste inviabilizaram o cultivo do camarão *Marsupenaeus japonicus*, sendo substituído por *Litopenaeus schmitti* e *Feneropenaeus subtilis*. Posteriormente a espécie exótica *L. vannamei* foi adotada devido seu desempenho zootécnico. No entanto,

entre 1994 e 1997, surgiram a Síndrome de Taura e a bacteriose hepatopancreatite necrosante que causaram muitos prejuízos. Após esta fase, a indústria do camarão cultivado apresentou seu melhor desempenho até 2003 (MARTINS; SANTOS, 2010). No ano seguinte, surgem a mionecrose infecciosa viral no nordeste e a Síndrome da mancha branca em Santa Catarina (ROCHA, 2008; MARTINS; SANTOS, 2010). Em 2005, a mancha branca foi responsável pela queda de 90% na produção do camarão na região de Laguna/SC (OSTRENSKY et al., 2008).

Nesta mesma época ocorreu a queda nas exportações pela ação “antidumping” dos Estados Unidos, o maior importador de camarões do Brasil. As exportações para os Estados Unidos caíram de 5,4% em 2003 para praticamente zero em 2007 e a desvalorização do produto gerou a maior crise do setor (ROCHA, 2008; MARTINS; SANTOS, 2010). Entre 2000 e 2003 o preço do camarão diminuiu 60% (OSTRENSKY et al., 2008).

A produção brasileira sofreu uma queda acentuada de 90.180 t em 2004, para uma média de 65.000 t entre 2005 e 2007. Apesar de ter iniciado 2007 em crise econômica e produtiva, chegou ao final do ano mostrando sinais de superação, com reais perspectivas de retomada do crescimento em 2008, em especial pela recuperação da região produtora no Nordeste e pela confiança no mercado interno (ROCHA, 2008). No Nordeste, o controle de doenças através do uso de probióticos e o manejo com maior densidade de camarões contribuiu para melhores resultados de produção (DANTAS, 2010).

No estado de Santa Catarina, embora metade das fazendas de cultivo não tenha apresentado a infecção pelo vírus da mancha branca, as restrições impostas à produção e comercialização impulsionaram a queda da produção que diminuiu 93% de 2004 para 2007 (ROCHA, 2008).

Enquanto as exportações não voltam aos patamares anteriores, o mercado interno que consumia 25% da produção (até 2004) passou a absorver 53% em 2006 e 76% em 2007. O consumo médio anual de camarão pelo brasileiro é de 250 g, um consumo baixo em comparação ao mundial (700 g) e ao mexicano (1.300 g). A exploração do mercado interno pode absorver pelo menos 300.000 t de camarão fresco, cinco vezes a produção atual (ROCHA, 2007). O consumo *per capita* de pescados no Brasil é de 6,9 kg, enquanto a média mundial é de 17,1 kg (FAO, 2010).

No nordeste, a produção que era 90% exportada, a partir de 2009 passou a ser absorvida pelo mercado interno, garantindo o crescimento do setor. O mercado interno tem ainda grande potencial de exploração e está mais satisfeito com os produtos, pois até pouco tempo os camarões de melhor qualidade eram exportados. Atualmente, não se observa diferença entre o produto comercializado na região e o exportado (DANTAS, 2010).

Vale ressaltar que os camarões de cultivo ainda enfrentam um mercado consumidor exigente em alguns locais. Segundo Freitas et al. (2009), em Laguna, a maior região produtora de camarão de Santa Catarina, a população mostra grande preferência pelo camarão nativo em detrimento ao de cultivo, salvo os turistas na época do verão.

Outro entrave enfrentado pelos produtores são os problemas ambientais. A produção de camarões realizada de maneira descontrolada já causou prejuízos em diversos países produtores, mas segundo vários autores este impacto ambiental pode ser evitado (NASCIMENTO et al., 2007; OSTRENSKY et al., 2008; REIS, 2008).

Segundo Nascimento et al. (2007) a pesca extrativista de camarões causa um impacto ambiental maior que a carcinicultura. A pesca com redes destrói a fauna acompanhante devastadoramente, para cada quilo de camarão nativo pescado, são mortos e devolvidos ao mar 1-28 kg de peixes e outros organismos marinhos enquanto os impactos causados pela carcinicultura são localizados, identificáveis e com reais possibilidades de mitigação ou eliminação.

A produção de camarões em cativeiro é uma atividade que pode ser auto-sustentável, tanto em termos ambientais quanto socioeconômicos, trazendo muitos benefícios para as comunidades produtoras (REIS, 2008, ROCHA, 2010), auxiliando na redução da pobreza pela geração de negócios, renda, divisas e empregos para trabalhadores com baixo nível de escolaridade e sem qualificação profissional (ROCHA, 2010).

A carcinicultura brasileira utiliza apenas 3,3% do seu potencial (ROCHA, 2010) e a longo prazo tem potencial para se recuperar e retomar o ritmo de crescimento. A atividade é considerada rentável no estado de Santa Catarina, mas os produtores apresentam dificuldades como o elevado risco de quebra de produção, políticas de incentivo inexistentes, pouca cooperação entre produtores, dificuldades de conseguir linhas de crédito e problemas ambientais (FREITAS et al., 2009). São necessárias medidas intervencionistas para evitar estes problemas e propiciar o desenvolvimento (OSTRENSKY et al., 2008).

Várias ações estão sendo feitas em Santa Catarina para viabilizar a carcinicultura, como o desenvolvimento de novas tecnologias de produção, pesquisas com probióticos, cultivo de peixes marinhos em viveiros de camarões e monitoramento sanitário (COSTA, 2010).

A consolidação e ampliação da aquicultura no estado dependem da continuidade das ações governamentais na busca da regulamentação e organização do setor, além do investimento em desenvolvimento tecnológico. A recuperação da carcinicultura necessitará de um aporte financeiro aos produtores para readequação do sistema de produção (COSTA, 2010).

1.2 Astaxantina

A astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β -caroteno-4,4'-diona) é um carotenóide classificado como xantofila, encontrada nos camarões, salmão, truta, carapaças de crustáceos como a lagosta, gônadas de mexilhões e vieiras, algas e microalgas (MATSUNO, 1985; NOBRE et al., 2006).

A astaxantina apresenta cadeia central de 40 carbonos (Figura 1), com simetria central e dois carbonos assimétricos nas posições 3 e 3', onde estão ligadas as hidroxilas. Assim, apresenta dois enantiômeros 3S, 3'S 3R, 3'R e as formas mesoméricas 3R, 3'S e 3'R, 3S. Na alga *H. pluvialis* e nas pétalas da *Adonis annua* apresenta-se na forma 3S, 3'S, na levedura *Phaffia rhodozyma* como 3R, 3'R e no camarão e lagosta nas três formas (JACKSON et al., 2008).

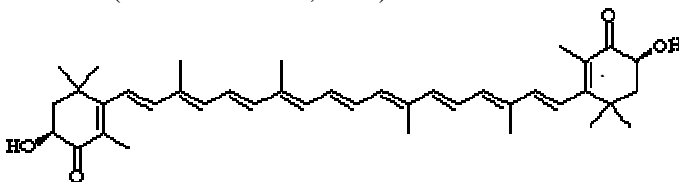


Figura 1 Estrutura da astaxantina. Fonte: BRITTON, 1995 (adaptado).

A microalga *H. pluvialis* é a melhor fonte natural de astaxantina (1,8 mg/g de biomassa seca), com potencial para produção comercial (NOBRE et al., 2006). De cor verde na sua forma vegetativa, a *H. Pluvialis* submetida a algum tipo de estresse como irradiação ou limitação de nitrogênio, forma cistos e acumula astaxantina no citoplasma tornando-se vermelha (YOUNG; LEE, 1991; FAN et al., 1994).

Outras fontes produtoras de astaxantina com interesse científico ou comercial são as leveduras *Phaffia rhodozyma* (JOHNSON; AN, 1991) e *Xanthophyllomyces dendrorhous* (MARKOVITS, 1991), as algas *Chlorella vulgaris* (GOUVEIA et al., 1997), *Chlorococcum sp.*, *C. zofingiensis* (PENG et al., 2008), *Monoraphidium sp.* (FUJII et al., 2009), a bactéria *Agrobacterium aurantiacum* (FRASER et al., 1997) e as flores *Adonis aestivalis* e *Adonis annua* (PONCE-PALAFOX et al., 2006), sendo as plantas deste gênero as únicas que sintetizam astaxantina (MARKOVITS, 1991).

A astaxantina também é produzida sinteticamente em escala industrial. Este composto sintético é muito utilizado na indústria de rações para animais. No entanto, para indústria farmacêutica é necessário um elevado grau de segurança com relação à pureza, estabilidade e ausência de compostos não tóxicos que ainda não são garantidos pela indústria, abrindo espaço para o mercado de compostos de origem natural (JACKSON et al., 2008).

Esta tendência por compostos de origem natural é evidente na indústria de alimentos que vem utilizando carotenóides de origem biológica em substituição aos corantes sintéticos, em resposta aos consumidores que se mostram cada vez mais exigentes preferindo alimentos coloridos com produtos naturais e seguros (FONTANA et al., 2000; STRINGHETA, 2008).

Embora esta tendência pelo uso de produtos naturais como corantes alimentares e ingredientes funcionais com benefícios à saúde esteja bem difundido (GOSWAMI et al., 2010, KADAM; PRABHASANKAR, 2010; NGO et al., 2011), o grande embargo para o uso da astaxantina natural é o seu elevado custo de produção. O preço do quilo da astaxantina derivada de algas e resíduo de camarão está em torno de 3 a 12 mil euros (AWARENET, 2004 apud FERRARO et al., 2010). A astaxantina sintética custa em torno de 2500 dólares o quilo (LORENZ; CYSEWSKI, 2000).

O principal mercado para a astaxantina é a indústria de ração para aquicultura, principalmente para salmão e truta. Este mercado ainda utiliza mais de 95% de astaxantina sintética, mas a demanda dos consumidores abre oportunidade para a produção de astaxantina natural (LORENZ; CYSEWSKI, 2000). A astaxantina também é utilizada na indústria farmacêutica para produção de suplementos alimentares e cosméticos e em menor escala para ração de aves e pigmentação dos ovos, bovinos e suínos (GOSWAMI et al., 2010).

Para o homem, as fontes alimentares de astaxantina ficam restritas aos salmonídeos, camarões, mexilhões e vieiras, considerados seguros para consumo. Já os suplementos alimentares devem ser consumidos com maior cautela, pois embora os trabalhos publicados não mostrem toxicidade da astaxantina em doses farmacológicas, esta prática não é permitida em alguns países da Europa (PETRI; LUNDEBYE, 2007). A biomassa seca de *H. pluvialis* está aprovada como corante alimentar para peixes no Japão e Canadá e como suplemento dietético nos Estados Unidos e alguns países europeus (LORENZ; CYSEWSKI, 2000).

Nos camarões cultivados alimentados com ração padrão (não suplementadas com carotenóides) foram relatados valores de carotenóides totais no músculo de 0,5 mg/100g a 1,65 mg/100g (CHIEN; JENG, 1992; PASSOS, 2006 respectivamente) e para os selvagens de 1,04 mg/100g a 1,74 mg/100g (SACHINDRA et al., 2005 e YANAR et al., 2004). No exoesqueleto de camarões cultivados 0,3 mg/100g a 5,3 mg/100g (CHIEN; JENG, 1992; PASSOS, 2006, respectivamente), e para selvagens de 3,5 mg/100g a 15,3 mg/100g para cabeça (SACHINDRA et al., 2005) e 4,83 mg/100g para todo exoesqueleto (PU et al., 2010).

O salmão selvagem, outra fonte importante de carotenóides marinhos, apresenta carotenóides totais entre 0,55 a 0,64 mg/100g e o cultivado entre 0,77 e 0,84 mg/100g, sendo que para o selvagem 100% dos carotenóides foram identificados como astaxantina enquanto para o de cultivo foram encontradas astaxantina e cantaxantina em proporções iguais, refletindo os carotenóides da ração (JOHNSTON et al., 2006). Tolasa et al. (2005) encontraram 0,68 mg/100g de astaxantina no filé de salmão selvagem.

1.3 Propriedades biológicas da astaxantina

Os animais não sintetizam carotenóides, apenas convertem os carotenóides adquiridos pela dieta como, por exemplo, a conversão do β -caroteno, luteína e zeaxantina em astaxantina em camarões e a conversão do β -caroteno em vitamina A em mamíferos (CHIEN; JENG, 1992; BRITTON, 1995).

Embora não apresente atividade como provitamina A nos mamíferos, a astaxantina vem sendo estudada por seus inúmeros efeitos fisiológicos em animais e humanos. Nos vegetais e microrganismos

fotossintetizantes atuam como pigmentos coadjuvantes na captação da luz (MIKI, 1991).

Grande parte dos efeitos da astaxantina são atribuídos às suas propriedades antioxidantes. Estudos têm demonstrado que esta capacidade é cerca de 100 a 500 vezes superior que outras substâncias como a vitamina C, α -tocoferol e outros carotenóides, como zeaxantina, β -caroteno, luteína e licopeno (MIKI, 1991; NAGUIB, 2000; PALOZZA et al., 2008). Essa elevada atividade pode ser relacionada à sua estrutura química. Os anéis polares da astaxantina ligam-se a espécies reativas de oxigênio na superfície das células, enquanto a cadeia carbonada age no interior da membrana celular (GOTO et al., 2001; PASHKOW et al., 2008). Os grupos hidroxila nos anéis terminais da molécula de astaxantina parecem ser os principais sítios de remoção de radicais livres.

1.3.1 Funções biológicas da astaxantina no camarão

A astaxantina é o principal carotenóide nos organismos marinhos. Simpson (1982) também descreve outros carotenóides encontrados em alimentos marinhos como a cantaxantina (camarão, caranguejo), tunaxantina (atum, sardinha, arenque, camarão), β -caroteno (caranguejo, camarão, mexilhão, truta), luteína (peixes águas doces, camarão, mexilhão, sardinha, caranguejo) e zeaxantina (camarão, mexilhão, arenque, sardinha).

Estes carotenóides conferem coloração característica aos animais, com grande importância fisiológica. No meio ambiente, a coloração natural do camarão, assim como em outros animais, é uma característica importante para sobrevivência da espécie, já que muitos eventos estão ligados à presença da cor como atração sexual, defesa e camuflagem (LATSCHA, 1989; BRITTON, 1995).

No camarão e no exoesqueleto de outros crustáceos, as xantofilas apresentam-se ligadas fortemente com as proteínas, não apresentando a coloração laranja característica destes compostos. O acúmulo do complexo caroteno-proteína em grande quantidade revela-se com coloração entre o verde, azul e púrpura (CHIEN; JENG, 1992), pois este complexo apresenta comprimento de onda de 580 nm. Com o cozimento, ocorre a quebra do complexo e a astaxantina livre revela sua coloração (amarela, laranja e vermelha) com comprimento de onda de 470-472 nm (Figura 2). Esta modificação no comprimento de onda é

chamado efeito batocrômico (WEESIE et al., 1995; CIANCI et al., 2002).



Figura 2 Camarão fresco (a) e após cozimento (b), efeito batocrômico. (Fotos da autora).

No habitat natural, os animais adquirem os carotenóides através da cadeia trófica. Com o crescimento das fazendas de cultivo, o uso de carotenóides nas rações tornou-se necessário para espécies como salmão, truta e camarão, absorvendo a maior parte da astaxantina na produção de ração para aquicultura (JOHNSON; AN, 1991).

Os carotenóides são importantes para manter a saúde animal e responsáveis pela coloração característica de vários frutos do mar. Vários estudos mostram que a astaxantina é o pigmento mais efetivo na coloração de crustáceos (YAMADA et al., 1990; BOONYARATPALIN et al., 2001; ARREDONDO-FIGUEROA et al., 2003), no entanto o camarão converte outros carotenóides em astaxantina, como β -caroteno (YAMADA et al., 1990; BOONYARATPALIN et al., 2001; SUPAMATTAYA et al., 2005), cantaxantina (YAMADA et al., 1990) e capsantina (ARREDONDO-FUIGUEROA et al., 2003). Segundo Supamattaya et al. (2005), o camarão converte o β -caroteno em astaxantina sem prejudicar o desenvolvimento, coloração e resistência à síndrome viral da mancha-branca.

Embora a quantidade ideal de astaxantina para cada fase de desenvolvimento e espécie de camarão não esteja determinada, sabe-se

que o excesso não é absorvido ou é posteriormente excretado ou catabolizado (CHIEN; JENG, 1992).

A maioria dos estudos para verificar os efeitos da astaxantina no desenvolvimento, sobrevivência e coloração do camarão utilizam rações com dosagens de 50 ppm a 400 ppm de astaxantina, sendo que os efeitos variam conforme a espécie, tempo de tratamento e fase de desenvolvimento dos camarões, conforme exemplos a seguir.

Os estudos mostram que a adição de pequenas quantidades de astaxantina na dieta por períodos mais longos tendem a otimizar o desenvolvimento dos camarões. Boonyaratpalin *et al.* (2001) em estudo com *Penaeus monodon* mostraram que uma ração com pequenas quantidades de astaxantina (50 ppm) por períodos mais longos (7-8 semanas) resultou em melhor coloração do camarão que uma dieta com grande quantidade de pigmento em um curto período. Além disso, camarões alimentados com rações contendo carotenóides por longos períodos apresentam melhores taxas de sobrevivência (CHIEN; JENG, 1992).

Chien e Jeng (1992) em um amplo estudo comparando diferentes fontes de pigmentos (astaxantina, β -caroteno e alga *Dunaliella salina*) e tempo de experimento observaram que a astaxantina foi o pigmento mais efetivo com relação à pigmentação e sobrevivência de camarões (*Penaeus japonicus*). Para promover a pigmentação sugerem uma ração com 1000 ppm de astaxantina durante um mês antes da despesca, sendo que a alimentação com carotenóides por períodos mais prolongados melhora a taxa de sobrevivência.

Nos camarões cultivados as rações suplementadas com carotenóides como astaxantina, zeaxantina, luteína e β -caroteno além do aumento na coloração citada, proporcionam aumento de sobrevivência, resistência ao estresse, resistência à síndrome da mancha branca, essencialidade para reprodução (CHIEN; JENG, 1992; BOONYARATPALIN *et al.*, 2001; PAIBULKICHAKUL *et al.*, 2008), melhora da função imune (NONWACHAI *et al.*, 2010), aumento do ganho de peso (PONCE-PALAFOX *et al.*, 2006) e proteção aos danos causados pelo excesso de luz (YOU *et al.*, 2006). A suplementação com carotenóides também previne e melhora os sintomas da síndrome da deficiência de pigmento caracterizada pelo branqueamento dos ovários e reduzido desempenho inicial de larvas de camarões (REGUNATHAN; WESLEY, 2006) e é fundamental para reprodução de machos e fêmeas (PAIBULKICHAKUL *et al.*, 2008).

Estudo avaliando a resposta a astaxantina de machos e fêmeas observou que fêmeas alimentadas com ração suplementada a 100 ppm obtiveram maior ganho de peso que os machos, enquanto que os suplementados a 500 ppm não mostraram diferença, enquanto a taxa de fecundação aumentou para ambos com 500 ppm de suplementação (PAIBULKICHAKUL et al., 2008).

Grande parte destes efeitos benéficos podem ser devidos à proteção antioxidante conferida pela astaxantina e demais carotenóides. Nos camarões, salmão e outros animais, a astaxantina também apresenta efeito protetor contra oxidação do colesterol e ácidos graxos poliinsaturados (PALLOZA, 2008; MCNULTY et al., 2008).

1.3.2 Nutrição e saúde

Entre os carotenóides marinhos, a astaxantina e fucoxantina são os carotenóides com maior potencial benéfico sobre a saúde humana, sendo a astaxantina o mais estudado. Seus efeitos estão ligados a sua atividade antioxidante, mas também a outros efeitos com mecanismos ainda não esclarecidos (MIYASHITA, 2009).

Segundo Hussein et al. (2006) o consumo de 6 mg/dia de astaxantina (*H. pluvialis*) por oito semanas não provoca efeitos adversos em humanos. Para Satoh et al. (2009), o consumo de 4, 8 ou 20 mg de astaxantina/dia, por adultos saudáveis durante quatro semanas, não mostrou efeitos tóxicos, demonstrando segurança para o consumo.

Petri e Lundebye (2007) em estudo com ratas alimentadas por sete e 14 dias com doses de astaxantina de 0,3, 1 e 3% (Sigma) em dieta hiperlipídica, observaram manchas nos rins das ratas alimentadas com 3% astaxantina (+0,4 g/dia) pelo acúmulo de astaxantina nestas regiões e alterações no leucograma, demonstrando sinais de lesão.

Embora estes estudos demonstrem apenas o efeito agudo da ingestão de astaxantina, a segurança do consumo em longo prazo pode ser confirmada pela longa história de exposição dos humanos as pequenas quantidades de astaxantina presentes em alimentos como camarão, salmão e lagostas (JACKSON et al., 2008).

O mecanismo de ação da astaxantina sobre diversas doenças pode estar relacionado com a proteção conferida as células. Através de sua atividade antioxidante, neutraliza radicais livres danosos as células e também promove maior comunicação entre as células através do aumento da expressão gênica de proteínas de conexão (HUSSEIN et al., 2006).

A atividade antioxidante da astaxantina *in vivo* é muito superior a de outros compostos. Isso pode ser devido a sua localização na membrana celular, onde se apresenta transversal à membrana podendo interagir com compostos intra e extracelulares (GOTO et al., 2001).

A astaxantina foi muito mais eficiente que o β -caroteno, cantaxantina e luteína em proteger o colesterol da oxidação tanto espontânea como a induzida (PALOZZA et al., 2008). Este efeito superior da astaxantina deve-se a sua estrutura química que apresenta um grupo hidroxil e uma carbonila no anel de beta ionona, enquanto a cantaxantina apresenta apenas o ceto, a luteína apenas o hidroxil e o β -caroteno nenhum. Esta estrutura apresenta um equilíbrio entre a forma cetônica e enólica em solução aquosa resultando em um sistema com um átomo de hidrogênio capaz de servir como bloqueador da reação por radicais livres (NAGUIB, 2000).

Estes resultados são muito importantes para auxiliar na prevenção da oxidação do colesterol no organismo humano, já que o colesterol oxidado está envolvido com a formação e gravidade das placas de ateroma. Para indústria de alimentos estes dados também são importantes, pois a formação de óxidos de colesterol durante o processamento e armazenamento de alimentos deve ser evitado, já que seu consumo pode trazer problemas à saúde dos consumidores (PALOZZA et al., 2008).

Entre os efeitos farmacológicos em humanos destaca-se o efeito neuroprotetor, proteção contra raios ultravioleta, aumento da taxa de fertilidade (efeito antioxidante e protetor do DNA), bloqueio da expressão de genes pró-inflamatórios, diminuição do estresse oxidativo causado pela hiperglicemia em diabéticos, proteção cardiovascular (HUSSEIN et al., 2006), protetores em casos de doenças oculares, da pele, das funções hepáticas e imunológica (GUERIN et al., 2003), câncer (PALOZZA et al., 2009) e gástrica contra úlceras causadas por Naproxen (antinflamatório) (KIM et al., 2005) e coadjuvante nas intoxicações por mercúrio (AUGUSTI et al., 2008).

Cremades et al. (2007) mostraram que ratos com hepatoma alimentados com hidrolisado de lagosta e astaxantina (100 mg/kg) apresentaram maior sobrevivência e menor perda de peso que o grupo controle. Palozza et al. (2009) mostraram efeito protetor da astaxantina proveniente de *H. pluvialis* contra o câncer de intestino.

Com relação à saúde ocular, Hussein et al. (2006) em sua revisão citam estudos mostrando a diminuição da peroxidação lipídica e estresse celular com o consumo de astaxantina. Um dos mecanismos de proteção

sugerido é devido à capacidade da astaxantina em filtrar a luz azul que é danosa para os olhos.

Em estudo para avaliar a influência da astaxantina sobre a saúde muscular, Aoi et al. (2008) observaram que ratos recebendo astaxantina durante quatro semanas aumentaram a utilização de gordura como substrato durante exercício e também mostrou efeito antioxidante, o que aumentou a resistência ao exercício.

Vários estudos estão investigando os efeitos da astaxantina sobre a saúde cardiovascular, em especial devido a seu efeito antioxidante, já que os radicais livres estão envolvidos em diversas doenças cardíacas, isquêmicas, coronarianas e hipertensão (HUSSEIN et al., 2006). Segundo Pashkow et al. (2008) muitos antioxidantes têm demonstrado efeitos *in vitro* ou em animais, mas os novos estudos apontam a astaxantina como um antioxidante realmente efetivo contra as doenças cardiovasculares.

Como citado acima, a astaxantina apresenta propriedades importantes para indústria farmacêutica e de alimentos. Na indústria alimentícia deve-se focar os estudos sobre a estabilidade dos carotenóides nos produtos, em especial quando adicionados como corantes.

Embora os estudos atuais mostrem resultados interessantes há necessidade de mais pesquisas sobre a toxicidade em humanos, de fontes naturais e sintéticas, e assim determinar doses seguras para realização de mais estudos em humanos saudáveis e doentes. Especialmente, devem-se incentivar os estudos com alimentos fontes de astaxantina e verificar se as concentrações naturais causam efeitos metabólicos significativos.

1.4 Lecitina na ração de camarões

A lecitina, como fonte de fosfolipídios, apresenta vários benefícios aos camarões (COUTTEAU et al., 1997). Os fosfolipídios são fundamentais para o funcionamento normal das células e órgãos, pois participam como mensageiros entre as células regulando processos de crescimento, proliferação, diferenciação, metabolismo, entrada de nutrientes, transporte de íons e morte celular programada (GONZÁLEZ-FÉLIX; PEREZ-VELAZQUEZ, 2002).

Os fosfolipídios apresentam propriedades emulsificantes, que facilitam a digestão e absorção de ácidos graxos e demais substâncias lipossolúveis, facilitando seu transporte do intestino para hemolinfa

(COUTTEAU et al., 1997). Como são constituintes das lipoproteínas (GONZÁLEZ-FÉLIX; PEREZ-VELAZQUEZ, 2002) também participam do transporte de substâncias lipossolúveis entre tecidos e órgãos (COUTTEAU et al., 1997).

A influência da lecitina de soja para camarões foi investigada em vários estudos demonstrando melhores resultados em termos de sobrevivência, crescimento, metabolismo lipídico e resistência ao estresse (COUTTEAU et al., 1997; GONG et al., 2000a, b), mas sua relação com a absorção de astaxantina não foi avaliada. Segundo Gong et al. (2000b) a fosfatidilcolina (principal fosfolípídio encontrado na lecitina) facilita a mobilização e transporte dos lipídios do hepatopâncreas até os músculos, através da hemolinfa.

Os fosfolípídios apresentam em sua estrutura uma calda apolar formada pelos ácidos graxos e uma cabeça polar. Como todos os carotenóides, as xantofilas (incluindo a astaxantina) também apresentam natureza apolar, mas os grupos hidroxilas presentes na molécula conferem características polares (BRITTON, 1995). Estes grupos hidroxilas têm afinidade com as cabeças polares dos fosfolípídios presentes na lecitina de soja, o que pode favorecer o transporte e a estabilidade da astaxantina nos camarões.

González-Félix et al. (2002a,b), em estudo com camarões *L. vannamei* e Kumaraguru Vasagam et al. (2005) com camarões *Penaeus monodon* observaram maior ganho de peso em camarões alimentados com lecitina em comparação com a mesma ração sem a adição dos fosfolípídios. Estes autores observaram estas respostas para diferentes fontes de lipídios vegetais, mas não verificaram diferença entre o grupo alimentado com óleo de peixe com e sem a adição de lecitina.

Em estudo com camarões *L. vannamei* juvenis Gong et al. (2000a) observaram que a adição de fosfolípídios e colesterol na ração diminuiu a concentração de lipídios totais no músculo, enquanto a adição de fosfolípídios sem colesterol não provocou alteração no músculo, mas aumentou a concentração de lipídios totais no hepatopâncreas (órgão de reserva lipídica). Em estudo para identificar o componente presente na lecitina responsável pelos efeitos, foi observado que a fosfatidilcolina purificada não provocou alteração dos lipídios totais no músculo (GONG et al., 2000b).

A adição de lecitina de soja é mais eficiente que a adição de fosfatidilcolina purificada (principal componente da lecitina) (GONG et al., 2002b) ou que a adição dos outros fosfolípídios presentes na lecitina, sem fosfatidilcolina (COUTTEAU et al., 1996), na promoção de

crescimento dos camarões. Segundo os autores outros constituintes presentes na lecitina de soja podem ter efeito benéfico sobre os camarões.

Em pesquisa com trutas, Takahashi et al. (2008) verificaram que a pré-mistura da astaxantina com lecitina de soja antes da adição na ração aumenta a incorporação do pigmento no músculo dos peixes. Os peixes alimentados com óleo de peixe e soja adicionados de astaxantina apresentaram 1-1,5 mg/kg de músculo, enquanto os tratados com lecitina de soja e astaxantina 22,9 mg/kg. Os pesquisadores também verificaram que a perda de astaxantina após o processamento da ração é menor na ração adicionada de lecitina em comparação ao óleo de soja e óleo de peixe.

Salvador et al. (2008) em experimento com trutas também observaram efeito positivo da lecitina de soja sobre o transporte, digestibilidade e deposição da cantaxantina no músculo das trutas alimentadas com ração adicionada de um mix de lecitina e óleo de peixe.

Além da presença de lecitina de soja, Torrissen (1985) e Jensen et al. (1998) observaram que o aumento da concentração de lipídios na ração aumenta a deposição de astaxantina no filé de trutas.

Embora os estudos analisando os efeitos e benefícios dos fosfolipídios para o camarão estejam bem documentados, não foram encontrados estudos relacionando a adição de fosfolipídios e carotenóides nas rações para camarões.

1.5 Importância comercial da coloração dos camarões

Os camarões são muito apreciados em todo mundo por suas características sensoriais e por apresentar excelente composição de minerais, proteínas e baixo teor de lipídios (FREYGANG, 2007, MUSAIGER; D'SOUZA, 2008). Além disso, a adição de carotenóides nas rações melhora a aparência e também o valor nutritivo dos camarões, tornando este produto mais atrativo ao consumidor.

Dentre os atributos sensoriais, a cor é um dos principais critérios de compra, já que representa o atributo sensorial prontamente disponível ao consumidor. Camarões com coloração laranja mais intensa apresentam melhores preços e aceitação no mercado consumidor (LATSCHA, 1989, BOONYARATPALIN et al., 2001, TAKAHASHI et al., 2008, TUME et al., 2009).

No primeiro momento, a cor e aparência do camarão cru é o principal atributo de decisão de compra do camarão fresco, enquanto a decisão de recompra é determinada pelos atributos dos camarões cozidos (ERICKSON et al., 2007). Erickson et al. 2006 observaram que a aparência, cor e aroma são os principais atributos que influenciam na aceitabilidade do camarão cozido. A coloração laranja após o cozimento é associada a frescor e qualidade do produto (BOONYARATPALIN et al., 2001), tanto que Erickson et al. (2007) observaram que esta coloração diminui com o tempo de armazenamento.

Considerando que a maior parte dos consumidores tem preferência pela compra de camarões frescos (ERICKSON et al., 2007), destacamos a importância de verificar como as estratégias de suplementação irão influenciar a cor e a escolha dos camarões crus e cozidos.

Além disso, alimentos contendo nutrientes bioativos como carotenóides, com benefícios a saúde tem ganhado destaque no mercado de alimentos. A adição de substâncias que melhoram os atributos sensoriais e a qualidade nutricional torna os produtos mais atrativos ao consumidor, como já observado no mercado de salmão, com excelentes resultados (BAKER; GUNTHER, 2004).

Vale destacar que embora os consumidores incluam critérios de qualidade na escolha dos camarões e relatem estar dispostos a pagar mais se o produto apresentar melhor qualidade, o preço continua a ser o principal fator na decisão de compra (ERICKSON et al., 2006). Com relação ao preço de camarões de cultivo e selvagens, destaca-se a queda do preço dos camarões de cultivo e o aumento do preço do camarão rosa selvagem, considerado de melhor qualidade pelos consumidores (FAO, 2009).

2Referências

AOI, W. et al. Astaxanthin improves muscle lipid metabolism in exercise via inhibitory effect of oxidative CPT I modification. **Biochemical e Biophysical Research Communications**, v. 366, n. 4, p. 892-897, 2008.

ARREDONDO-FIGUEROA, J.L.; PEDROZA-ISLAS, R.; PONCE-PALAFIX, J.T.; VERNON-CARTER, E.J. Pigmentation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chili (*Capsicum annuum*) in comparison to astaxanthin. **Revista Mexicana de Ingenieria Quimica**, v. 2, p. 101-108, 2003.

AUGUSTI et al. Effect of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 212–219, 2008.

BAKER, R.; GUNTHER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 484–488, 2004.

BOONYARATPALIN, M.; SUPAMATTAYA, K.; BRITTON, G.; SCHLIPALIUS, L.E. Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. **Aquaculture Research**, v. 32, sup.1, p. 182-190, 2001.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**, v. 9, p. 1551-1558, 1995.

CHIEN, Y.H.; JENG, S.C. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. **Aquaculture**, v. 102, p. 333-346, 1992.

CHIEN, Y.H.; PAN, C.H.; HUNTER, B. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. **Aquaculture**, v. 216, p. 177-191, 2003.

CIANCI, M. et al. The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: β -Crustacyanin at 3.2-Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 9795-9800, 2002.

CREMADES, O. et al. Nutritional treatment of cancer cachexia in rats. **European Journal of Nutrition**, v. 46, p. 347–353, 2007.

COSTA, S.W. Aquicultura no Estado de Santa Catarina: situação atual e perspectivas. **Revista da ABCC**, n 1, p. 49-50, jun. 2010.

COUTTEAU, P. GEURDEN, I.; CAMARA, M.R.; BERGOT, P.; SORGELOOS, P. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. **Aquaculture**, v. 155, p. 149-164, 1997.

D'ABRAMO, L.R. Nutritional Requirements of the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Comparisons with Species of *Penaeid* Shrimp. **Reviews in Fisheries Science**, v. 6, n. 1-2, p. 153-163, 1998.

DANTAS, E. A tendência é favorável à expansão das áreas de cultivo. **Revista da ABCC**, n 1, p. 32-39, jun. 2010.

ERICKSON, M.C. et al. Sensory differentiation of shrimp using a trained descriptive analysis panel. **LWT**, v.40, p. 1774-1783, 2007.

ERICKSON, M.C.; BULGARELIL, M.A.; RESURRECCION, A.V.A.; VENDETTI, R.A.; GATES, K.A. Consumer differentiation, acceptance, and demographic patterns to consumption of six varieties of shrimp. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.15, p.35-51, 2006.

FAN, L.; VONSHAK, A.; BOUSSIBA, S. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v. 30, p. 829-833, 1994.

FAO (Food and Agriculture Organization). **Yearbook. Fishery and aquaculture statistics 2008**. Rome, 2010. 72pp.

FAO (Food and Agriculture Organization). Fisheries and Aquaculture Department. **The state of world fisheries and aquaculture 2008**. Rome, 2009. 176pp.

FERRARO, V. et al. Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. **Food Research International**, n. 43, p. 2221–2233, 2010.

FONTANA, J.D.; MENDES, S.V.; PERACETTA, L.F. Carotenóides. Cores Atraentes e Ação Biológica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 12, p. 40-45, 2000.

FRASER, P.D.; MIURA, Y.; MISAWA, N. *In Vitro* Characterization of Astaxanthin Biosynthetic Enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 6128-6135, 1997.

FREITAS, R.R.; VINATEA, L.; NETTO, S.A. Analysis of the marine shrimp culture production chain in Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 2, p. 287-295, 2009.

FUJII, K. Potential use of the astaxanthin-producing microalga, *Monoraphidium sp.* GK12, as a functional aquafeed for prawns. **Journal of Applied Phycology**, *in press*, 2009.

FREYGANG, J. **Determinação do colesterol e ácidos graxos em camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados na região de Santa Catarina e efeito do seu consumo no perfil lipídico de ratos (*Rattus norvegicus*)**. 2007. 68f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007. Disponível em: <<http://www.bu.ufsc.br>>. Acesso em 11 maio 2009.

GOSWAMI, G.; CHAUDHURI, S.; DUTTA, D. The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacological importance. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1925–1939, 2010.

GOTO, S. et al. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 1512, n. 26, p. 251-258, 2001.

GONG, H.; LAWRENCE, A.L.; JIANG, D.H.; CASTILLE, F.L.; GATLIN, D.M. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. **Aquaculture**, v. 190, p. 305–324, 2000a.

GONG, H.; Lawrence, A.L.; Jiang, D.H.; Gatlin, D.M. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* II. Active components of soybean lecithin. **Aquaculture**, v. 190, p. 325-342, 2000b.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M.E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 210-216, 2003.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L.; LAWRENCE, A.L.; GATLIN, D.M.; PEREZ-VELAZQUEZ, M. Growth, survival and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and absence of phospholipids. **Aquaculture**, v. 205, p. 325-343, 2002a.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L. et al. Effect of dietary phospholipid on essential fatty acid requirements and tissue lipid composition of *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture**, v. 207, p. 151-167, 2002b.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M. L.; PEREZ-VELAZQUEZ, M. Current status of lipid nutrition of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, VI, 2002. Cancún, Quintana Roo, México. **Memorias...**Cancún, 2002. Disponível em:
<<http://w3.dsi.uanl.mx/publicaciones/maricultura/vi/pdf/A03.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2009.

GOUVEIA, L.; GOMES, E.; EMPIS, J. Use of *Chlorella vulgaris* in diets for rainbow trout to enhance pigmentation of muscle. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 7, p. 61–70, 1997.

HUSSEIN, G. et al. Astaxanthin, a Carotenoid with potential in human health and nutrition. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 443-449, 2006.

JACKSON, H.; BRAUN, C.L.; ERNST, H. The Chemistry of Novel Xanthophyll Carotenoids. **American Journal of Cardiology**, v. 101, p. 50D–57D, 2008.

JENSEN, C. et al. Effect of dietary levels of fat, a-tocopherol and astaxanthin on colour and lipid oxidation during storage of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and during chill storage of smoked trout. **Z Lebensm Unters Forsch A**, v. 207, p. 189–196, 1998.

JOHNSON, E.A.; AN, G.H. Astaxanthin from Microbial Sources. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 297-326, 1991.

JOHNSTON, I. A. et al. Muscle and flesh quality traits in wild and farmed Atlantic salmon. **Aquaculture**, v. 256, p. 323-336, 2006.

KADAM, S.U.; PRABHASANKAR, P. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. **Food Research International**, v. 43, p. 1975–1980, 2010.

KIM, J.H. et al. Protective effect of astaxanthin on naproxen-induced gastric antral ulceration in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 514, p. 53-59, 2005.

KUMARAGURU VASAGAM, K.P.; RAMESH, T.S.; BALASUBRAMANIAN, T. Dietary value of different vegetable oil in black tiger shrimp *Penaeus monodon* in the presence and absence of soy lecithin supplementation: Effect on growth, nutrient digestibility and body composition. **Aquaculture**, v. 250, p. 317– 327, 2005.

LATSCHA, T. The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. **Advances in Tropical Aquaculture**, v. 9, p. 319-325, 1989.

LORENZ, R.T.; CYSEWSKI, G.R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **TIBTECH**, v. 18, p. 160-167, 2000.

MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R. et al. Optimización de alimentos y prácticas de alimentación en el cultivo de camarón en el Noroeste de México. In: Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, VI, 2002, Cancún. Memorias... Cancún, Quintana Roo, México, 2002.

MARTINS, P.C.C.; SANTOS, M.L. PSF/Camarão - Programa de saúde nas fazendas de camarão. **Revista da ABCC**, n 1, p. 40-45, jun. 2010.

MARKOVITS, A. *Adonis*. Potential fuente vegetal de astaxantina. **Chile Pesquero**, v. 69, p. 25-26, 1991.

MATSUNO, T. New structures of carotenoids in marine animals. **Pure and Applied Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 659-666, 1985.

MCNULTY, H.; JACOB, R.F.; MASON, R.P. Biologic Activity of Carotenoids Related to Distinct Membrane. Physicochemical Interactions. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10, p. S20-S29, 2008.

MIKI, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 141-146, 1991.
MIYASHITA, K. Function of Marine Carotenoids. **Forum of Nutrition**, v. 61, p. 136-146, 2009.

MUSAIGER, A.O., D'SOUZA, R. The effects of different methods of cooking on proximate, mineral and heavy metal composition of fish and shrimps consumed in the Arabian Gulf. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, n. 1, p. 103-109, 2008.

NAGUIB, Y.M.A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 1150-1154, 2000.

NASCIMENTO, P.A.M. et al. Cultivar camarões. A chance de mitigar os impactos ambientais da pesca. **Panorama da Aqüicultura**, v. 5, n. 28, p. 19-22, 1995.

NGO, D.H. et al. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. **Food Research International**, 2011. No prelo.

NOBRE, B. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. **European Food Research Technology**, v. 223, p. 787-790, 2006.

NONWACHAI, T. et al. Growth, non specific immune characteristics, and survival upon challenge with *Vibrio harveyi* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) raised on diets containing algal meal. **Fish and Shellfish Immunology**, v.29, p. 298-304, 2010.

OGUNLADE, I.; OLAOFE, O.; FADARE, T. Chemical composition, amino acids and functional properties of selected seafoods. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 3, n. 2, p. 130-133, 2005.

OSTRENSKY, A., BORGHETTI, J.R., SOTO, D. **Aquicultura no Brasil. O Desafio é crescer**. Organização das Nações Unidas (FAO). Brasília, 2008. 276p. Disponível em: http://tuna.seap.gov.br/legislacao/AQUICULTURA_COMPLETO.pdf
Acesso em: 14 maio 2009.

PALOZZA, P.; BARONE, E.; MANCUSO, C.; PICCI, N. The protective role of carotenoids against 7-keto-cholesterol formation in solution. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 309, p. 61–68, 2008.

PALOZZA, P. et al. Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 283, n. 1, p. 108-117, 2009.

PAIBULKICHAKUL, C. et al. Improved maturation of pond-reared, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using fish oil and astaxanthin feed supplements. **Aquaculture**, v. 282, p. 83–89, 2008.

PASSOS, R. **Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para aquíicultura**. 2006. 145f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. Disponível em: <www.bu.ufsc.br>. Acesso em: 11 maio 09. 2006.

PENG, J. et al. Comparative analysis of astaxanthin and its esters in the mutant E1 of *Haematococcus pluvialis* and other green algae by HPLC with a C30 column. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 52, n. 12, p. 1108-1115, 2008.

PETRI, D.; LUNDEBYE, A.K. Tissue distribution of astaxanthin in rats following exposure to graded levels in the feed. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 202-209, 2007.

PASHKOW, F.J.; WATUMULL, D.G.; CAMPBELL, C.L. Astaxanthin: A Novel Potential Treatment for Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10, supl.1, p. 58-68, 2008.

PONCE-PALAFOX, J. T. Carotenoids from plants used in diets for the culture of the Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Revista Mexicana de Ingenieria Química**, v. 4, p. 157-165, 2006.

PU, J.; BECHTEL, P.J.; SATHIVEL, S. Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil: Effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates. **Biosystems engineering**, v. 107, p. 365-371, 2010.

REGUNATHAN, C.; WESLEY, S.G. Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using *Spirulina* as a carotenoid source. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, n. 6, p. 425-432, 2006.

REIS, J.N.P. Sustentabilidade na Produção de Camarão: O Caso da Comunidade de Requenguela, no Município de Icapuí – Ceará. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 39, n. 2, p. 251-262, 2008.

ROCHA, I.P. Panorama da carcinicultura Brasileira em 2007. Desempenho, desafios e oportunidades. **Panorama da Aquicultura**, v. 17, n. 104, p. 26-31, 2007.

ROCHA, I.P. Desempenho da carcinicultura brasileira em 2007: desafios e oportunidades para 2008. **Revista da ABCC**, p. 20-23, mar., 2008.

ROCHA, I.P.; ROCHA, D.M. Análise da produção e do mercado interno e externo do camarão cultivado. **Revista da ABCC**, n 1, p. 18-23, jun. 2010.

SACHINDRA, N.M., BHASKAR, N., MAHENDRAKAR, N.S. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 85, p. 167–172, 2005.

SALVADOR, A. et al. Effect of soybean phospholipids on canthaxanthin lipoproteins transport, digestibility, and deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 9202–9207, 2007.

SATOH, A. Preliminary clinical evaluation of toxicity and efficacy of a new astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* extract. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 44, p. 280-288, 2009.

SIMPSON, K. L. Carotenoid pigments in seafood. In: MARTIN, R.E. et al. **Chemistry and biochemistry of marine food products**. Westport, Connecticut, 1982. p. 115-153.

STRINGHETA, P.C. **Pesquisas e tendências no uso de corantes alimentares**. Disponível em:
<<http://www.dta.ufv.br/daeal/download/corantes.ppt#288,12,Slide 12>>
Acesso em: 08 abril, 2008.

SUPAMATTAYAA, K.; KIRIRATNIKOMA, S.;
BOONYARATPALIN, M.; BOROWITZKA, L. Effect of a *Dunaliella*
extract on growth performance, health condition, immune response and
disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).
Aquaculture, v. 248, p. 207– 216, 2005.

TAKAHASHI, N.S. et al. Truta salmonada. Processo produtivo em
constante aprimoramento no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 18,
n. 105, p. 28-33, 2008.

TOLASA, S., CAKLI, S. & OSTERMEYER, U. Determination of
astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. **European Food Research
and Technology**, 221, 787-791, 2005.

TORRISSEN, O.J. Pigmentation of salmonids: Factors affecting
carotenoid deposition in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).
Aquaculture, v. 46, n. 2, p. 133-142, 1985.

TUME, R.K. et al. Effect of background color on the distribution of
astaxanthin in black tiger prawn (*Penaeus monodon*): Effective method
for improvement of cooked color. **Aquaculture**, v. 296, 129–135, 2009.

YAMADA, S.; TANAKA, Y.; SAMESHIMA, M.; ITO, Y.
Pigmentation of Prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids I. Effect
of dietary astaxanthin, β -carotene and canthaxanthin on pigmentation.
Aquaculture, v. 87, p. 323-330, 1990.

YANAR, Y.; ÇELİK, M.; YANAR, M. Seasonal changes in total
caortenoid contents of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* and
Metapenaeus conoceros) inhabiting the eastern Mediterranean. **Food
Chemistry**, v. 88, p. 267-269, 2004.

YOU, K. et al. Effects of different light sources and illumination methods on growth and body color of shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 252, p. 557– 565, 2006.

YONG, Y.Y.R.; LEE, Y.K. Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)? **Phycologia**, v. 30, n. 3, p. 257-261, 1991.

WEESIE, R.J. et al. Protein-chromophore interactions in α -crustacyanin, the major blue carotenoprotein from the carapace of the lobster, *Homarus gammarus* a study by ^{13}C magic angle spinning NMR. **FEBS Letters**, v. 362, p. 34-38, 1995.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA LECITINA DE SOJA SOBRE A PIGMENTAÇÃO DE CAMARÕES ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM *Haematococcus pluvialis*

Este capítulo apresenta dois artigos em que são apresentados os resultados dos efeitos da adição de lecitina de soja sobre a deposição de carotenóides nos camarões *Litopenaeus vannamei* alimentados com ração suplementada com *H. pluvialis*.

O artigo apresentado no item 2.1 apresenta os resultados do experimento piloto, que serviu de referência para o estudo final apresentado no item 2.2, que inclui a avaliação de preferência dos consumidores com relação à coloração dos camarões obtidos.

2.1 Pigmentação e conteúdo de carotenóides de camarão alimentado com *Haematococcus pluvialis* e lecitina de soja

Este artigo foi publicado na Revista Aquaculture Nutrition e está apresentado conforme as normas de publicação do referido periódico.

Pigmentation and carotenoid content of shrimp fed with *Haematococcus pluvialis* and soy lecithin

Jane Parisenti, Luiz Henrique Beirão, Marcelo Maraschin, José Luiz Mouriño, Felipe do Nascimento Vieira, Luana Helena Bedin, Eliseu Rodrigues.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effects of *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) (carotenoid source) and *H. pluvialis* plus soy lecithin on development, carotenoid content, and pigmentation of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). 180 shrimps (7.8g) were divided in 6 tanks (n=30) and fed with control food, *H. pluvialis*, and *H. pluvialis* plus soy lecithin for two weeks. Carotenoids were extracted with acetone and quantified by UV-vis spectrophotometry and astaxanthin was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Color was analyzed by colorimetry. Lecithin/*H. pluvialis* group presented higher survival rate (100%) when compared to control group (93.3%). *H. pluvialis* and lecithin/*H. pluvialis* groups presented higher red-like color (a^* 19.9 and 20.6) than control (a^* 16.4). Lecithin/*H.*

pluvialis group presented higher carotenoids content (8.2 mg kg⁻¹ muscle, 26.8 mg kg⁻¹ exoskeleton) and astaxanthin (8.5mg kg⁻¹ muscle, 23.3mg kg⁻¹ exoskeleton) than control (carotenoids: 4.2mg kg⁻¹ muscle, 12.3mg kg⁻¹ exoskeleton; astaxanthin: 3.2mg kg⁻¹ muscle, 8.1mg kg⁻¹ exoskeleton). Feeding with 60ppm carotenoids (from *H. pluvialis*) during two weeks was sufficient for favoring red-like pigmentation in shrimp and lecithin increased astaxanthin content only in exoskeleton.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, astaxanthin, carotenoids, phospholipids, soybean lecithin, color.

Introduction

Sea food has been widely accepted mainly due to its sensory properties and nutritional value. Red-like color, which has been associated with freshness and product quality, is one of the major factors responsible for shrimp acceptability, being provided by astaxanthin (3, 3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione), also present in salmonids (Boonyaratpalin *et al.* 2001).

Like other animals, shrimps are unable to biosynthesize carotenoids, which are obtained through algae consumption from the environment. For shrimp farming, feeding must be supplemented (Arredondo-Figueroa *et al.*, 2003; Boonyaratpalin *et al.* 2001; Yamada *et al.* 1990), being algae *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) the richest natural source of astaxanthin. The amount of pigment required for each species and the effect of fed time have not been determined yet as well as the features that affect its absorption and deposition.

Similar to other carotenoids, astaxanthin presents non-polar nature. However, the hydroxyl groups present in the molecule provide polar characteristics that have affinity for the polar heads of phospholipids (Britton, 1995). Phospholipids may act as emulsifiers, making the digestion and absorption of lipid-soluble substances, like astaxanthin, easy (Cotteau *et al.* 1997).

The influence of phospholipids on shrimp was investigated in several studies showing positive effects on survival, growth, lipid metabolism, or stress resistance (González-Félix *et al.* 2002; Gong *et al.* 2000a,b; Coutteau *et al.* 1997), but studies examining its correlation with astaxanthin metabolism in shrimp are lacking. Soybean lecithin is the most important commercial source of phospholipids. According to Gong *et al.* (2000b), in shrimps phosphatidylcholine (the main

phospholipid in lecithin) makes lipid mobilization and transport from hepatopancreas to muscles through haemolymph easier.

Trout, salmon, and shrimp are known as astaxanthin sources for human consumption and, due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, supplements of astaxanthin have been researched, especially microalgae *H. pluvialis* (Guerin et al., 2003). In Brazil, consumption of shrimp is enhanced for its nutritional value, availability and economical importance.

Feed represents the largest variable cost item in shrimp farms, and their profits depend on nutritionally complete and cost-effective feeds (Gong *et al.*, 2001). So far, and for the best of our knowledge, there is no information available concerning the effect of soybean lecithin on astaxanthin content of shrimp's tissues fed with biosources of that pigment. Thus, taking into consideration the well known positive effects of astaxanthin supplementation on the color of shrimp's exoskeleton and muscle, this studied aimed to evaluate whether soy lecithin promotes a more attractive red-orange color in *Litopenaeus vannamei* shrimps fed with *H. pluvialis*.

Material and methods

Experiment was carried out at Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), Federal University of Santa Catarina - UFSC, Florianópolis – Santa Catarina State, southern Brazil) during June/2008.

A batch of 180 adult shrimps *L. vannamei* (Boone 1931), known as Pacific white shrimp, from LCM/UFSC were used in this study. Indoor shrimp culture used in this experiment was carried out in six tanks (300 l) covered with black color fiberglass and filled with beach sand at the bottom. Each tank was supplied with 150 l seawater (80% renewed daily) and 30 shrimp (7.87 ± 0.6 g; mean \pm SE). One heater per tank (150 W), coupled at thermostat, was used. Water temperature was kept at 28 ± 2 °C and measured twice daily. Water flow rates ranged from 80% daily and all tanks were aerated. Shrimps were maintained in tanks under continuous simulated daylight system (12 h dark).

Shrimps were fed with control food containing no astaxanthin or other carotenoids for 5 days (acclimation period). Carotenoid content in this control was lower than 3 ppm as analyzed by UV-vis spectrophotometry and described below.

Three experimental diets were prepared with identical basal ingredients, except *H. pluvialis* and soy lecithin content (Table 1).

Table 1 Composition of experimental diets.

Diet ingredient (g kg ⁻¹)	Control	<i>H. pluvialis</i> .	Lecithin/ <i>H. pluvialis</i> .
Fish meal ¹	360	360	360
Soybean protein ²	120	120	120
Wheat meal ²	250	250	250
Wheat flour ³	190	190	190
Vitamin/mineral premix ⁴	20	20	20
Cod oil ⁵	25	25	25
Cholesterol ⁶	0.5	0.5	0.5
Soybean oil ⁷	20	20	-
Soy lecithin ⁸	-	-	20
<i>Haematococcus pluvialis</i> ⁹	-	5	5

¹ Contained 544 g kg⁻¹ protein and 100 g kg⁻¹ lipids.

² Vitao, Paraná, Brazil.

³ Contained 116.6 g kg⁻¹ protein and 13.5 g kg⁻¹ lipids.

⁴ 25^{AP} Plus (Nutron), Paraná, Brazil.

⁵ Delaware, Porto Alegre, Brazil.

⁶ Sigma (95%).

⁷ Leve (IMCOPA), Paraná, Brazil.

⁸ SolecTM SG (Solae), Brazil.

⁹ *Haematococcus pluvialis* (dry biomass; ALGAMAC AST, Aquafauna Bio-Marine, INC).

After acclimation, diets were randomly distributed in six tanks (2 control diet, 2 astaxanthin-added and 2 astaxanthin/lecithin-added diets). Shrimps were fed three times daily, at 9 a.m., 1 p.m., and 5 p.m., during 4 weeks. Diet added to the tanks was equivalent to 3% of wet shrimp biomass.

According to each formulation, ingredients were ground, weighted, and manually mixed. Cod oil and soy oil or lecithin premix with *H. pluvialis* were added and mixed, followed by water addition. This blend was ground using a meat grinder in order to obtain a spaghetti-like feed (1.5 mmØ) broken into pellets of 1 cm. Pellets were dried at 40 °C for 12 h in an airflow oven and stored at 7 °C until use. Composition of experimental diets was determined according to AOAC methods (2005), presenting 55 g kg⁻¹ moisture, 370 g kg⁻¹ proteins, 340 g kg⁻¹ carbohydrates, 125 g kg⁻¹ lipids, 85 g kg⁻¹ ash and 20 g kg⁻¹ crude fiber. Soybean lecithin used was obtained from Solae (SolecTM SG, Brazil), and chemical data from the manufacturer indicated that acetone

insoluble was 62%. Total carotenoids concentration in feed was 3 ppm for control and 60 ppm for *H. pluvialis* and lecithin/*H. pluvialis* diets.

Survival and weight data were daily recorded. After two weeks, shrimps were collected, weighted and kept in ice for immediate color evaluation. Samples were frozen for no longer than five days in a freezer at -18°C until carotenoid analysis.

Color was determined at the beginning of the experiment (group zero), and at the end of feeding trial. Shrimp color from each treatment (pooled samples of 10 shrimp per tank) was determined before and after cooking (1 min, 100 ml water at 100°C) and evaluated right after collecting using a colorimeter (Minolta Chromo Meter CR 400, Osaka, Japan) calibrated on a white reference plate before use. Measurements were taken from three parts along the shrimp body (closest to head; middle; close to tail) and performed in the colorimetric space L^* , a^* , b^* (CIELab system), at $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Total carotenoids and astaxanthin analysis were determined in the beginning (group zero) and at the end of feeding trial (pooled samples of 10 shrimp per tank). Analyses were performed under low light conditions.

Extraction of carotenoids was determined according to Tolasa *et al.* (2005) with some modifications. Raw shrimp muscle and exoskeleton were separately ground and blended for 1 min. Eight grams of homogenized past were extracted 3 times with 30 ml of acetone. Each acetone extract was collected in separating funnels. 25 ml hexane, 100 ml water, and 0.5 g NaCl were added for separating water soluble compounds. Funnels were kept in dark for 20 min and shaken once. Hexane extract was filtered and dehydrated by anhydrous sodium sulfate and poured in volumetric flask (25 ml). Total carotenoid concentration was determined spectrophotometrically (spectrophotometer Shimadzu LC-10) at 470 nm and calculated according to a standard curve ($y = 0.1847x$ $r^2 = 0.9951$) of astaxanthin (Sigma, 98%). Analyses were performed in triplicate.

Astaxanthin content was determined in hexane extracts by HPLC. Samples were injected into a liquid chromatograph (Shimadzu LC-10AD), equipped with a C_{18} reverse-phase column (Vydac 201TP54, 250 mm x 4.6 mm \varnothing , BioRad) protected with a guard-column (Vydac 201TP54 30mm x 4.6 mm \varnothing , BioRad) and an UV/visible detector ($\lambda = 477$ nm). Mobile phase was methanol: acetonitrile (90:10 v/v) at flow rate of 0.8 ml min^{-1} . Running time was 20 min and carotenoid identification was carried out by comparing retention time of

the standard compound of interest (astaxanthin, Sigma, 98%, $R_t = 3.81$ min) under the same experimental conditions. Astaxanthin quantification was performed by integrating the area of the corresponding peak and using an external standard curve of carotenoid ($y = 44231.563x$, $r^2 = 0.990$). Astaxanthin content was calculated with mean \pm SD, considering three sequential injections per sample.

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test ($p < 0.05$). The correlations between the total carotenoids or astaxanthin content and color values of raw and cooked shrimp were determined by the Pearson's correlation coefficient (R). Each tank is considered the experimental unit ($n=2$). Statistical analyses were carried out using BioEstat 5.0 statistical software.

Results and discussion

Lecithin/*H. pluvialis* and *H. pluvialis* group showed significant growth, expressed in weight gaining and higher survival rate, when compared to control group (Table 2). These results suggest that addition of *H. pluvialis* influences positively the physiological function of shrimp.

Table 2 Final weight (g) and survival (%) of shrimp fed control, *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*), and lecithin/*H. pluvialis* diets.

	Zero	Control	<i>H. pluvialis</i>	Lecithin/ <i>H. pluvialis</i>
Weight (g)	7.87 ± 0.61^a	9.36 ± 1.85^{ab}	9.93 ± 1.71^{ab}	10.10 ± 1.5^b
Survival (%)	-	93.33 ± 0.01^a	98.33 ± 2.36^b	100 ± 0.00^b

Data are expressed as means ($n=2$) \pm SD. Means on the same line with different letter are significantly different (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$).

Studies carried out with lecithin (Kumaraguru Vasagam *et al.* 2005; Coutteau *et al.* 1997) or carotenoid addition (Supamattaya *et al.* 2005; Arredondo-Figueroa *et al.* 2003) showed higher weight gaining for shrimps fed with supplemented diets. Nevertheless, studies evaluating the use of lecithin combined with carotenoids were not so far.

Regarding only to carotenoid addition, studies have reported that carotenoid like astaxanthin, capsanthin (extracted from pepper) (Arredondo-Figueroa *et al.* 2003), and β -carotene (from *Dunaliella salina*) (Supamattaya *et al.* 2005) supplement action provided higher

weight gaining and survival of shrimp fed with carotenoids. Chien & Jeng (1992) found a positive correlation between survival rates and pigment concentration in prawn tissue indicating that pigment (astaxanthin and β -carotene) may play a role in improving the survival. Passos (2006) and Boonyaratpalin *et al.* (2001) did not find weight and survival difference between shrimp fed with diet supplemented with astaxanthin and β -carotene, respectively.

This beneficial effect of astaxanthin may be due to its antioxidant activity. Astaxanthin has a strong ability to eliminate free radicals and singlet oxygen (Britton, 1995) providing antioxidant protection which increases resistance of physiological stress (Chien *et al.*, 2003), enhances the resistance to white spot syndrome virus (Supamattaya *et al.*, 2005), ammonia excess, improves hepatopancreatic function (Pan *et al.*, 2003), protecting cholesterol and polyunsaturated fatty acids from oxidation (Palloza, 2008; McNulty *et al.*, 2008). Moreover, astaxanthin accumulation protects cells from photooxidation because, due to its transparency, shrimps are light sensible (You *et al.*, 2006). Such benefits may work positively on shrimp development, providing weight gaining and survival of groups supplemented with *H. pluvialis*.

Shrimps from *H. pluvialis* and lecithin/*H. pluvialis* groups presented higher values for red-like color (higher a^* value) than control group. After cooking, *H. pluvialis* and lecithin/*H. pluvialis* groups presented higher values for darkness (lower L^* value) and red-color pigmentation (higher a^* value) than control group (Table 3, Fig. 1).

Table 3 Color parameters of shrimp fed control, *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*), and lecithin/*H. pluvialis* diets.

		Control	<i>H. pluvialis</i>	Lecithin/ <i>H. pluvialis</i>
Raw	L^*	40.02 ± 0.09^a	39.66 ± 0.07^a	39.78 ± 0.33^a
	a^*	-2.72 ± 0.07^a	-1.34 ± 0.28^b	-1.48 ± 0.22^b
	b^*	-0.60 ± 0.46^a	1.82 ± 0.23^a	1.17 ± 0.45^a
Cooked	L^*	68.32 ± 0.01^a	65.08 ± 0.68^b	65.38 ± 0.12^b
	a^*	16.37 ± 0.01^a	19.98 ± 0.13^b	20.63 ± 0.08^b
	b^*	27.53 ± 0.02^a	27.92 ± 0.38^a	27.94 ± 0.19^a

Data are expressed as means ($n=2$) \pm SD. Means on the same line with different letter are significantly different (ANOVA, Tukey test, $p<0.05$). L^* lightness with 100 = absolute white and 0 = absolute black; a^* = "redness" coordinate; b^* = "yellowness" coordinate.

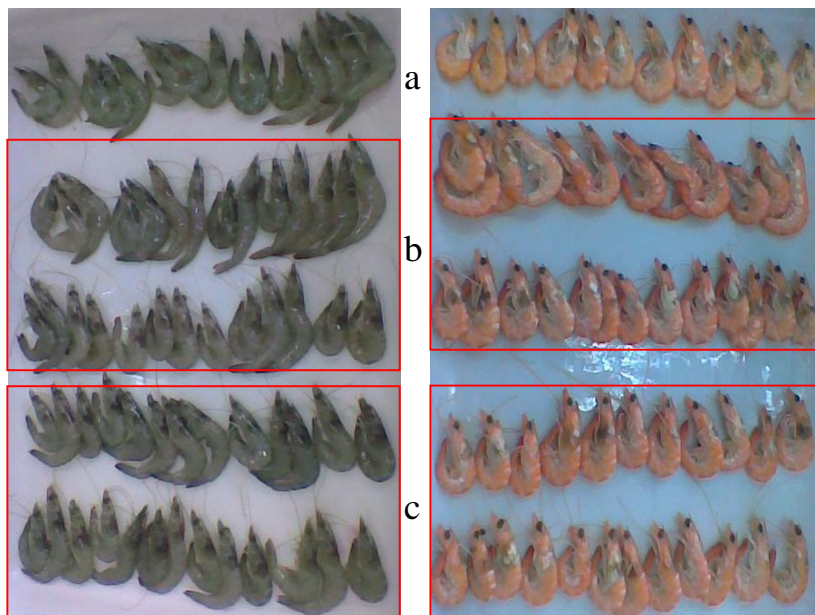


Figura 1 Fresh and cooked shrimp fed control (a), *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) (b), and lecihtin/*H. pluvialis* (c) diets. Figura não apresentada no artigo original.

These results are in agreement with several works reporting intense red color in shrimp fed with carotenoids added in diet. According to these studies carotenoids supplementation of 100-300 ppm increased red-color pigmentation in shrimp after 4 – 8 weeks (Yamada *et al.* 1990; Vernon-Carter *et al.* 1996; Boonyaratpalin *et al.* 2001; Arredondo-Figueroa *et al.* 2003; Supamattaya *et al.* 2005; Passos, 2006). Lower concentration of carotenoids and reduced feeding time provided intense red-color in the present study.

Pigmentation differences between fresh and cooked shrimps are due to bathochromic effect which is responsible for breaking astaxanthin/protein complex present in fresh shrimp. Free astaxanthin absorbs light at 470-472 nm (yellow, orange and red colors). Once this compound binds to protein there is a changing in wavelength to 580 nm (green, blue or purple) (Cianci *et al.* 2002; Weesie *et al.* 1995).

Shrimp raw color is important because consumers use this attribute for purchasing of fresh shrimp, but repurchase is dependent on the cooked characteristics (Erickson *et al.* 2007). Erickson *et al.* (2007) evaluated raw and cooked sensory attributes for fresh and frozen

commercial shrimp and showed that after storage raw shrimp increase brown color and cooked shrimp decrease red/orange color. This information confirms that red-like color is associated with freshness and product quality (Boonyaratpalin *et al.* 2001).

Although raw shrimp L* values (that represents darkness) did not present significant difference and variation on a* and b* values were favorable, other authors showed prominent dark-brown color in shrimps fed with carotenoids (Passos, 2006; Supamattaya *et al.* 2005; Boonyaratpalin *et al.* 2001). This prominent dark color in raw shrimp reported by these authors may be due to the using of higher carotenoids concentration and a period longer than the present study. Further studies are needed in order to verify when this dark-brown color occurs and whether it may affect the purchasing decision of consumers.

Chromatographic analyses of carotenoid extract from muscle tissue and exoskeleton showed astaxanthin ($R_t = 3.81$ min) and its ester ($R_t = 4.01$ min) as the major carotenoid in samples. Besides, the occurrence of zeaxanthin ($R_t = 4.31$ min) was detected in most of the samples.

Total carotenoids and astaxanthin content were higher in exoskeleton than in muscle for all groups. Lecithin/*H. pluvialis* presented higher total carotenoid content and astaxanthin than control group, differing from *H. pluvialis* group in astaxanthin content in exoskeleton (Table 4).

Table 4 Total carotenoid and astaxanthin (mg kg^{-1}) content in shrimp (muscle and exoskeleton) fed control, *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) and lecithin/*H. pluvialis* diets.

Carotenoids	Control	<i>H. pluvialis</i>	Lecithin/ <i>H. pluvialis</i>
Muscle	4.2 ± 0.2^a	6.7 ± 0.3^{ab}	8.2 ± 1.0^b
Exoskeleton	12.3 ± 0.6^a	25.8 ± 0.4^b	26.8 ± 1.2^b
Astaxanthin			
Muscle	3.2 ± 0.5^a	5.5 ± 1.1^{ab}	8.5 ± 1.3^b
Exoskeleton	8.1 ± 1.2^a	12.1 ± 1.7^b	23.3 ± 0.2^c

Data are expressed as means ($n=2$) \pm SD. Means on the same line with different letter are significantly different (ANOVA, Tukey test, $p<0.05$).

Several studies have reported higher carotenoid content in shrimp after supplementation with 50 ppm for 8 weeks (Boonyaratpalin *et al.* 2001), 100 ppm for 3 weeks (Passos, 2006), 200 ppm for 4 weeks (Arredondo-Figueroa *et al.* 2003) 100 ppm for 8 weeks (Yamada *et al.*

1990), and 20.000 ppm for 2 weeks (Vernon-Carter *et al.* 1996). Chien & Jeng (1992) concluded that the best feeding strategy for pigmentation was to feed the prawns a diet containing astaxanthin at 1000 ppm for 1 month before harvest. Passos (2006) evaluated the effect of a feed supplemented with 100 ppm of carotenoids (*H. pluvialis*) in *L. vanammei*. No differences were detected after two weeks. Only after three weeks of feeding the supplemented group presented higher astaxanthin content.

On the other hand, the present work showed a well-developed red color in shrimp fed with carotenoid at low concentration (60 ppm) and reduced time (2 weeks) in comparison with the results presented above. Reducing feeding time and astaxanthin concentration, necessarily for pigmentation, represents low-cost production once astaxanthin is very expensive. Besides, in agreement with Boonyaratpalin *et al.* (2001), high concentration of carotenoids and long periods of treatment may cause intense color, increasing production cost and being not attractive for consumption.

Differences in total carotenoids found in presented studies may be due to different species, feeding, habitat, and maturation stage (Yanar *et al.* 2004; Liñán-Cabello *et al.* 2002). For instance, studies (feed not supplemented) presented values ranging from 5 mg kg⁻¹ (Chien & Jeng, 1992) to 46.7 mg kg⁻¹ (Passos, 2006) for shrimp muscle and wild marine shrimps inhabiting the eastern Mediterranean presented 14.1 mg kg⁻¹ (*Penaeus semisulcatus*) and 16.9 mg kg⁻¹ (*Metapenaeus moniceros*) for total carotenoids (Yanar *et al.* 2004).

Correlation presented in Table 5 shows that muscle total carotenoid was positively correlated with a* in cooked shrimp. Exoskeleton total carotenoid was positively correlated with a* in raw and b* in cooked shrimps. Negative correlation was found between exoskeleton total carotenoids and L* in cooked shrimp. Astaxanthin content in muscle was positively correlated with a* value in cooked and raw shrimps, and negatively with L* value in cooked shrimp.

Table 5 Pearson's correlation coefficients of total carotenoids/astaxanthin and color parameters of shrimp.

Parameter	Raw			Cooked		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Carotenoids						
Muscle	0.029	0.611	-0.020	0.567	0.861*	0.521
Exoskeleton	-0.616	0.973*	0.465	-0.840*	0.384	0.924*
Astaxanthin						
Muscle	-0.645	0.879*	0.288	-0.818*	0.932*	0.707
Exoskeleton	-0.301	0.621	0.021	-0.631	0.800	0.543

* p<0.05.

This correlation shows that color parameters, specially a* value, that represents redness, are in agreement with carotenoid or astaxanthin content in shrimp and confirms that visual appearance, especially in cooked shrimp, is a practice criterion for purchasing shrimp with high carotenoid content.

For captive shrimp, besides pigmentation, supplementation of feed with carotenoids is important because these molecules are needed for reproductive capacity, protecting antioxidant and as precursors for retinoid molecules (Liñán-Cabello *et al.* 2003). In addition to more red-like pigmentation, the present study also showed higher weight gain and survival of lecithin/*H. pluvialis* group than control group, confirming beneficial effects of the added compounds.

Boonyaratpalin *et al.* (2001) referred to a greater consumer preference for more colorful shrimp. Analysis of consumers' preferences combined with instrumental analysis is important for verifying if the intensity of color obtained with the treatment was favorable.

In this study, feeding with 60 ppm carotenoids (from *H. pluvialis*) during two weeks was sufficient for favoring red-like color pigmentation in shrimp. Soybean lecithin did not increase astaxanthin level in muscle, but increased astaxanthin in exoskeleton of shrimp fed with *H. pluvialis* and soy lecithin. According to these results, feeding with 60ppm carotenoids (*H. pluvialis*) during two weeks before harvest has been sufficient for providing red color in shrimp.

Acknowledgements

The authors thank to Prof. Roberto Bianchini Derner from Laboratório de microalgas (UFSC) for supplying of *H. pluvialis*, Prof.

Daniel Barrera-Arellano from Universidade Estadual de Campinas and Solae for gently supply of lecithin; Prof. Roseane Fett, Ismael Ivan Rockenback and Priscilla Maria Menel Lemos for helping on analyses; all employes and students from Laboratório de Camarões Marinhos (UFSC); CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for fellowship.

References

- Arredondo-Figueroa, J.L., Pedroza-Islas, R., Ponce-Palafox, J.T. & Vernon-Carter, E.J. (2003) Pigmentation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chili (*Capsicum annuum*) in comparison to astaxanthin. *Rev. Mex. Ingen. Quim.*, **2**, 101-108.
- Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K., Britton, G. & Schlipalius, L.E. (2001) Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Res.*, **32**, 182S-190S.
- Britton, G. (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.*, **9**, 1551-1558.
- Cianci, M., Rizkallah, P.J., Olczak, A., Raftery, J., Chayen, N.E. & Zagalsky, P.F. (2002) The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: β -Crustacyanin at 3.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 9795-9800, 2002.
- Chien, Y.H. & Jeng, S.C. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes (1992) *Aquaculture*, **102**, 333-346, 1992.

Chien, Y.H., Pan, C.H., Hunter, B. (2003) The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture*, **216**, 177–191.

Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P. & Sorgeloos, P. (1997) Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*, **155**, 149-164.

Erickson, M.C., Bulgarelil, M.A., Resurreccion, A.V.A., Vendetti, R.A. & Gates, K.A. (2006). Consumer Differentiation, Acceptance, and Demographic Patterns to Consumption of Six Varieties of Shrimp. *J Aquatic Food Product. Technol.*, 15, 35 – 51.

Gong, H., Lawrence, A.L., Gatlin, D.M., Jiang, D.H. & Zhang, F. (2001). Comparison of different types and levels of commercial soybean lecithin supplemented in semipurified diets for juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Nutr.*, **7**, 11-17.

Gong, H., Lawrence, A.L., Jiang, D.H., Castille, F.L. & Gatlin, D.M. (2000A) Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. *Aquaculture*, **190**, 305–324.

Gong, H., Lawrence, A.L., Jiang, D.H. & Gatlin, D.M. (2000B) Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* II. Active components of soybean lecithin. *Aquaculture*, **190**, 325-342.

González-Félix, M.L., Lawrence, A.L., Gatlin, D.M. & Perez-Velazquez, M. (2002) Growth, survival and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and absence of phospholipids. *Aquaculture*, **205**, 325– 343.

- Guerin, M., Huntley, M.E. & Olaizola, M. (2003) *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *TRENDS Biotechnol.*, **21**, 210-216.
- Kumaraguru Vasagam, K.P., Ramesh, T.S. & Balasubramanian, T. (2005) Dietary value of different vegetable oil in black tiger shrimp *Penaeus monodon* in the presence and absence of soy lecithin supplementation: Effect on growth, nutrient digestibility and body composition. *Aquaculture*, **250**, 317– 327.
- Liñán-Cabello, M.A. Paniagua-Michel, J. Zenteno-Savín, T. (2003) Carotenoids and retinal levels in captive and wild shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutr.*, **9**, 383-389.
- McNulty, H., Jacob, R.F. & Mason, R.P. (2008) Biologic Activity of Carotenoids Related to Distinct Membrane. Physicochemical Interactions. *Am. J. Cardiol.*, **101**(10S),20-29.
- Palozza, P., Barone, E., Mancuso, C. & Picci, N. (2008) The protective role of carotenoids against 7-keto-cholesterol formation in solution. *Mol. Cell.Biochem.*,**309**, 61–68.
- Pan, C.H., Chein, Y.H., Hunter, B. (2003) The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 297, 107–118.
- Passos, R. (2006) *Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para aquíicultura*. PhD dissertation, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC. Available at: <http://www.bu.ufsc.br>. Accessed May 11, 2009.

Supamattaya, K., Kiriratnikoma, S., Boonyaratpalin, M. & Borowitzka, L. (2005) Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, **248**, 207– 216.

Tolasa, S., Cakli, S. & Ostermeyer, U. (2005) Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. *Eur. Food Res. Technol.*, **221**, 787-791.

Vernon-Carter, E.J., Ponce-Palafox, J.T. & Pedroza-Islas, R. (1996) Pigmentation of Pacific white shrimps (*Penaeus vannamei*) using Aztec marigold (*Tagetes erecta*) extracts as the carotenoid source. *ALAN*, **46**, 243-246.

Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M. & Ito, Y. (1990) Pigmentation of Prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids I. Effect of dietary astaxanthin, β -carotene and canthaxanthin on pigmentation. *Aquaculture*, **87**, 323-330.

Yanar, Y., Çelik, M., Yanar, M. (2004) Seasonal changes in total carotenoid contents of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* and *Metapenaeus conoceros*) inhabiting the eastern Mediterranean. *Food Chem.*, **88**, 267-269.

You, K., Yang, H., Liu, Y., Liu S., Zhou, Y. Zhang, T. (2006) Effects of different light sources and illumination methods on growth and body color of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **252**, 557– 565.

Weesie, R.J., Askin, D., Jansen, F.J.H.M., Groot, H.J.M., Lugtenburg, J. & Britton, G. (1995) Protein-chromophore interactions in α -crustacyanin, the major blue carotenoprotein from the carapace of the lobster, *Homarus gammarus* a study by ^{13}C magic angle spinning NMR. *FEBS Lett.*, **362**, 34-38.

2.2 Pigmentação e teor de astaxantina de camarões alimentados com *Haematococcus pluvialis* e lecitina de soja e preferência de cor dos consumidores

Este artigo será enviado para publicação na Revista Aquaculture e está apresentado conforme as normas de publicação do referido periódico.

Introdução

O camarão é o produto aquícola com maior representatividade econômica internacional, correspondendo a 15,4% do valor total dos produtos da pesca comercializados internacionalmente em 2008. Para atender esta demanda, as fazendas de cultivo estão em franco crescimento, em detrimento à pesca extrativista cada vez menos representativa. Com isso, o camarão branco *Litopenaeus vannamei* torna-se a espécie aquática mais cultivada mundialmente (FAO, 2010).

O consumo de camarões está associado principalmente aos seus atributos sensoriais, sendo a cor um dos principais critérios de compra (BOONYARATPALIN et al., 2001, TUME et al., 2009). Camarões com coloração laranja mais intensa apresentam melhores preços e aceitação no mercado consumidor (TUME et al., 2009).

A coloração laranja característica dos camarões é conferida pela astaxantina (3, 3'-dihydroxy-b,b-carotene-4,4'-dione), um carotenóide também presente nos salmonídeos (BOONYARATPALIN et al., 2001). Os camarões nativos adquirem este pigmento através do consumo de fitoplâncton, krill e microalgas produtoras de carotenóides como a *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) produtora de astaxantina, enquanto os camarões de cultivo devem receber este composto adicionado à ração (YAMADA et al., 1990; BOONYARATPALIN et al., 2001; ARREDONDO-FIGUEROA, 2003).

Com o aumento da produção de camarões em fazendas, aumenta também a demanda por insumos de alta eficiência. Entre estes, as rações destacam por representarem grande parte dos custos de produção e por fornecer todos os nutrientes necessários ao desenvolvimento dos camarões (FAO, 2009). Além da nutrição essencial, as rações suplementadas podem auxiliar nos atributos sensoriais e garantir melhor valor de mercado aos camarões, como é o caso da suplementação com carotenóides para conferir melhor coloração.

A quantidade de carotenóides e a coloração do camarão depende da disponibilidade deste composto na alimentação e da eficiência de sua absorção, transporte e deposição nos tecidos do camarão (CHIEN; JENG, 1992). A quantidade de pigmento requerido para cada espécie, o efeito do tempo e fatores que afetam sua absorção e deposição ainda não foram determinadas.

Em trutas, a adição de lecitina de soja na ração suplementada com carotenóides aumentou muito a incorporação destes compostos no músculo (TAKAHASHI et al., 2008, SALVADOR et al., 2008). Em camarões, sabe-se que os fosfolipídios (principal constituinte da lecitina) tem ação emulsificante tornando a digestão e absorção de substâncias lipossolúveis mais fácil (COUTTEAU et al., 1997).

Assim, considerando os efeitos da suplementação com carotenóides sobre a coloração dos camarões, o objetivo deste estudo é avaliar se a adição de lecitina de soja aumenta a deposição destes compostos nos camarões *Litopenaeus vannamei* e assim a eficiência da ração suplementada com *H. pluvialis* e avaliar a preferência dos consumidores com relação a esta coloração.

Material e métodos

Camarões e delineamento experimental

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis – Santa Catarina, durante junho/julho de 2009.

Foram utilizados 960 camarões adultos *L. vannamei* (Boone 1931), conhecido como Camarão Branco do Pacífico ($13,8 \pm 1,16$ g), cultivados no LCM/UFSC. Este experimento ocorreu em ambiente fechado, em 12 tanques de cultivo (6000 l). Foi utilizada água do mar, bombeada a $1,2 \text{ Lmin}^{-1}$ e os tanques aerados continuamente. Para manter a temperatura da água a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, foi utilizado um aquecedor (300 W), acoplado a um termostato. Os camarões foram mantidos em tanques em condições simulando a luz do dia (12 h de escuro). A qualidade da água foi monitorada semanalmente. A concentração de oxigênio dissolvido foi de $8,0 - 9,0 \text{ mg L}^{-1}$ e medida em cada tanque usando um oxímetro (Alfakit; AT 150). As concentrações de amônia (NH_3) (máxima $0,03 \text{ mg L}^{-1}$), nitrato (NO_3) (máxima $0,15 \text{ mg L}^{-1}$) e nitrito (NO_2) (não detectado) foram monitoradas usando os métodos padrões de controle de água descritos pela American Public Health Association (APHA, 1989).

Os camarões foram alimentados com ração controle sem adição de carotenóides por cinco dias (período de aclimação), sendo o teor de carotenóides menor que 3 ppm, analisado conforme descrito a seguir.

Rações

Foram preparadas quatro rações experimentais com os mesmos ingredientes basais, exceto pela adição de *H. pluvialis* e lecitina de soja, sendo ração controle, com adição de lecitina (Lec), com adição de *H. pluvialis* (Hp) e adição de *H. pluvialis*/lecitina (Lec/Hp), conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 Composição das rações experimentais.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Controle	Hp	Lec	Lec/Hp
Farinha de peixe	218	218	218	218
Proteína de soja ¹	130	130	130	130
Farinha de soja ¹	150	150	150	150
Farelo de trigo ¹	290,7	285,7	290,7	285,7
Farinha de trigo ²	150	150	150	150
Vitamina/mineral premix ³	10	10	10	10
Óleo de bacalhau ⁴	25	25	25	25
Colesterol ⁵	5	5	5	5
Vitamina C	1	1	1	1
Inositol	0,3	0,3	0,3	0,3
Óleo de soja ⁶	20	20	-	-
Lecitina de soja ⁷	-	-	20	20
<i>Haematococcus pluvialis</i> ⁸	-	5	-	5

¹ Jasmine, Paraná, Brazil.

² 116,6 g kg⁻¹ de proteínas e 13,5 g kg⁻¹ de lipídeos.

³ 25^{AP} Plus (Nutron), Paraná, Brasil.

⁴ Delaware, Porto Alegre, Brasil.

⁵ Sigma (95%).

⁶ Leve (IMCOPA), Paraná, Brasil.

⁷ SolecTM SG (Solae), Brasil.

⁸ *Haematococcus pluvialis* (biomassa seca; ALGAMAC AST, Aquafauna Bio-Marine, INC).

De acordo com cada formulação, os ingredientes foram moídos, pesados e manualmente misturados. O óleo de bacalhau ou a lecitina de soja foram previamente misturadas com o *H. pluvialis* e depois

adicionadas a mistura da ração. Esta mistura foi passada em um moedor de carne para obter os peletes de ração (1,5 mmØ) que eram quebrados em 1 cm de comprimento. Os peletes foram secos a 40°C por 12 h em uma estufa com circulação de ar e estocada a 7°C até o uso. A composição das rações foi determinada de acordo com a AOAC (2005), apresentando umidade de 65 g kg⁻¹, proteínas 320 g kg⁻¹, carboidratos 390 g kg⁻¹, lipídios 110 g kg⁻¹, cinzas 89 g kg⁻¹ e fibra bruta 20 g kg⁻¹. A lecitina de soja utilizada foi obtida da empresa Solae (SolecTM SG, Brasil; insolúveis em acetona 62%). A concentração de carotenóides totais na ração Controle e Lec foi de 3 ppm e Hp e Lec/Hp de 60 ppm.

Após aclimação, as rações foram distribuídas nos 12 tanques (3 Controles, 3 Lec, 3 Hp e 3 Lec/Hp). Os camarões foram alimentados três vezes ao dia, as 9, 13 e 17 horas, durante 28 dias. A ração era fornecida na quantidade equivalente a 3% do peso da biomassa de camarões.

Sobrevivência e ganho de peso

A sobrevivência dos camarões foi monitorada diariamente.

No primeiro dia de experimento os camarões foram pesados para obter o peso inicial. Após 14 e 28 dias, os camarões foram coletados, pesados e mantidos em gelo até análise de cor.

As amostras foram congeladas por no máximo cinco dias em freezer a -18 °C até as análises de carotenóides.

Análise de carotenóides e astaxantina

As análises de carotenóides totais e astaxantina foram determinadas após 14 e 28 dias de tratamento (10 camarões por tanque). As análises foram realizadas com baixa intensidade de luz.

As extrações de carotenóides foram realizadas de acordo com Tolasa *et al.* (2005) com algumas modificações. O músculo e exoesqueleto dos camarões crus foram separados e moídos em multiprocessador por 1 min. Oito gramas do homogeneizado foi utilizado para extração dos carotenóides com 30 ml de acetona, por três vezes. Os três extratos de acetona foram reunidos em um funil de separação e adicionado 25 ml de hexano, 100 ml de água e 0,5 g de NaCl, para separar os compostos solúveis em água. Os funis foram mantidos no escuro por 20 min e sacudidos uma vez. O extrato hexânico foi filtrado e desidratado em sulfato de sódio anidro e armazenado em balão volumétrico (25 ml). A concentração de carotenóides totais foi determinada em espectrofotômetro (Shimadzu LC-10) a 470 nm e

calculado de acordo com a curva padrão ($y = 0,1847x$ $r^2 = 0,9951$) de astaxantina (Sigma St. Louis – USA, 98% de pureza). As análises foram realizadas em triplicata.

A análise quali/quantitativa dos componentes carotenóides do extrato hexânico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa. Para tal, foram injetadas 10 μ l do extrato em cromatógrafo líquido Shimadzu SP 10A, equipado com coluna C18 de fase reversa (Vydac 201TP54, 250mm x 4.6mm – BioRad) e detector UV/Vis (Shimadzu SPD 10A, $\lambda=477$ nm). A fase móvel foi solução de metanol: acetonitrila (90: 10, v/v), em fluxo de 1mL/min. O tempo de corrida foi de 13 minutos e a identificação dos carotenóides de interesse realizada por comparação com o tempo de retenção de compostos padrões., sendo 3,8 a 4,0 para luteína, 4 a 4,2 para astaxantina, 4,3 a 4,5 para zeaxantina, 7,2 a 7,4 para β -criptoxantina, 9,7 a 9,9 para α -caroteno e 10,2 a 10,5 para β -caroteno. O teor de astaxantina foi calculado com base em curva padrão de astaxantina (Sigma, 98%), com cinco pontos ($y = 44231,56364 x$, $R^2 = 0,99024$), sendo considerada a média de 3 injeções sequenciais por amostra.

Análise colorimétrica

A cor foi determinada após 14 e 28 dias de experimento. A cor dos camarões de cada tratamento (15 camarões por tanque) foi determinada antes e após o cozimento (1 min, em 100 mL de água a 100°C) e avaliada usando um colorímetro (Minolta Chromo Meter CR 400, Osaka, Japan) calibrado com placa de referência antes do uso. As medidas foram tomadas do lado esquerdo do camarão, em três partes do corpo (próxima a cabeça, meio e próximo a calda) e analisada no espaço colorimétrico L* (branco-preto), a* (vermelho-verde), b* (amarelo-azul) (sistema CIELab), a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A partir dos valores de a* e b* foi calculado o valor de h (ângulo hue), conforme descrito em Kalinowski et al., 2005.

Análise sensorial: Teste de ordenação de preferência

O teste de ordenação de preferência foi realizado com 30 julgadores, de ambos os sexos e idade entre 20 e 50 anos. Os julgadores foram selecionados pelo critério de ser consumidor de camarões e as análises realizadas em um restaurante da cidade de Florianópolis/Santa Catarina. Foi avaliada a preferência pela cor dos camarões cozidos.

As amostras (Controle, Lec, Hp e Hp/lec) foram apresentadas codificadas, em pratos brancos e em ordem aleatória para serem ordenados em ordem decrescente de preferência. A amostra menos preferida recebe escore 3 e a mais preferida escore 1, baseado na preferência de cor.

Ao final, foram calculados os totais de ordenação para se estabelecer diferença de preferência significativa entre as amostras.

Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo teste de variância (ANOVA) e o Teste Tukey ($p < 0,05$). Cada tanque foi considerado uma unidade experimental ($n=3$). As análises estatísticas foram calculadas usando o programa BioEstat 5.0.

Resultados e discussão

Crescimento e sobrevivência

Não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso entre os camarões dos diferentes grupos experimentais, após 14 ($p=0,8866$) e 28 dias ($p=0,2114$) (Tabela 2). Todos os grupos apresentaram 100% de sobrevivência.

Tabela 2 Ganho de peso (g) de camarões alimentados com ração controle, Lec, Hp and Lec/Hp após 14 e 28 dias de experimento.

Grupo	Controle	Lec	Hp	Lec/Hp
14 dias	$0,62 \pm 0,62a$	$0,81 \pm 2,47a$	$0,20 \pm 0,88a$	$0,01 \pm 0,74a$
28 dias	$0,55 \pm 1,09a$	$0,55 \pm 1,21a$	$0,01 \pm 0,27a$	$1,61 \pm 0,75a$

Resultados expressos como média ($n = 3$) \pm DP. Peso aos 14 dias (peso inicial – peso após 14 dias); peso aos 28 dias (peso inicial – peso após 28 dias). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (ANOVA, $p < 0,05$).

Esta pequena variação de peso era esperada devido à fase de desenvolvimento dos camarões (adultos), onde o crescimento é desacelerado. Em concordância, Nonwachai et al. (2010), Passos (2006) and Boonyaratpalin et al. (2001) não encontraram diferença no peso final e sobrevivência de camarões alimentados com carotenóides.

Outros estudos demonstraram que a astaxantina (NIU et al., 2009), a capsantina (extraída da pimenta) (ARREDONDO-FIGUEROA et al., 2003) e o β -caroteno (*Dunaliella salina*) (SUPAMATTAYA et al. 2005) aumentaram o ganho de peso e sobrevivência de camarões. Estes

resultados diferentes são esperados devido às variações na quantidade de carotenóide suplementado (CHIEN; JENG, 1992, PAIBULKICHAKUL et al., 2008), reserva de carotenóides do camarão no início do experimento (PAIBULKICHAKUL et al., 2008) e principalmente fase de desenvolvimento do camarão (SUPAMATTAYA et al., 2005). Supamattaya et al. (2005) sugere que camarões maiores apresentam fisiologia diferente dos camarões pequenos, respondendo de maneira diferente a suplementação.

Estes efeitos benéficos da astaxantina e outros carotenóides encontrado por alguns estudos pode ser devido sua atividade antioxidante. A astaxantina tem forte capacidade de eliminar radicais livres e oxigênio singleto (BRITTON, 1995) promovendo proteção antioxidante e aumento a resistência ao estresse (CHIEN et al., 2003), melhorando a função imune (NONWACHAI et al., 2010), resistência ao vírus da mancha branca (SUPAMATTAYA et al., 2005), tolerância ao excesso de amônia, melhoria da função hepática (PAN et al., 2003) e proteção do colesterol e ácidos graxos polinsaturados da oxidação (PALLOZA, 2008; MCNULTY et al. 2008). Além disso, a astaxantina protege as células da foto oxidação, pois são muito sensíveis a luz devido a transparência de seu corpo (YOU et al., 2006).

Com relação à adição de lecitina de soja, alguns estudos (RE-ARAUJO; RUIZ, 2003; COUTTEAU et al., 1997) mostraram maior ganho de peso para camarões suplementados. González-Félix et al. (2002), em estudo com camarões *L. vannamei* e Kumaraguru Vasagam et al. (2005) com camarões *Penaeus Monodon* observaram maior ganho de peso em camarões alimentados com lecitina em comparação com a mesma ração sem a adição dos fosfolipídios. Estes autores observaram estas respostas para diferentes fontes de lipídios vegetais, mas não verificaram diferença entre o grupo alimentado com óleo de peixe com e sem a adição de lecitina. Estes autores também não observaram diferença na sobrevivência dos camarões experimentais.

Carotenóides totais e astaxantina

O teor de carotenóides e astaxantina totais no músculo dos camarões alimentados com as diferentes rações não apresentaram diferença significativa nos primeiros 14 dias de experimento, mas mostrou tendência de aumento nos grupos suplementados com Hp. Após 28 dias, os grupos suplementados com Hp apresentaram maior teor de carotenóides totais no músculo que os grupos Controle e Lec e o grupo

Lec/Hp maior teor de astaxantina total que os grupos Controle e Lec (Tabela 3).

No exoesqueleto, o grupo Hp apresentou maior teor de carotenóides totais e astaxantina total que o grupo controle, após 14 e 28 dias de experimento, enquanto o grupo Lec/Hp apresentou maior teor de carotenóides totais somente após 28 dias (Tabela 3).

Tabela 3 Carotenóides totais e astaxantina livre e total (mg kg⁻¹) de camarões (músculo e exoesqueleto) alimentados com ração controle, Lec, Hp e Lec/Hp por 14 e 28 dias.

Dia	Parâmetros	Controle	Lec	Hp	Lec/Hp
Músculo					
14	Carotenóide total	3,22 ± 1,59a	3,28 ± 0,75a	5,81 ± 1,98a	5,54 ± 1,20a
	Astaxantina livre	1,93 ± 1,31a	1,70 ± 0,76a	2,56 ± 1,20a	2,35 ± 0,80a
	Ester de astaxantina	2,45 ± 0,41a	2,21 ± 0,49a	3,02 ± 0,20a	2,25 ± 0,82a
	Astaxantina total	3,42 ± 0,61a	3,92 ± 1,16a	5,59 ± 1,40a	4,60 ± 0,52a
28	Carotenóide total	3,84 ± 0,18a	3,67 ± 0,48a	8,30 ± 0,56b	8,69 ± 0,51b
	Astaxantina livre	1,64 ± 0,05a	1,51 ± 0,52a	2,60 ± 0,57a	2,65 ± 0,24a
	Ester de astaxantina	1,08 ± 0,48a	1,66 ± 0,20a	1,87 ± 0,48a	2,07 ± 0,96a
	Astaxantina total	2,72 ± 0,53a	3,17 ± 0,40a	4,47 ± 0,32ab	4,72 ± 1,15b
Exoesqueleto					
14	Carotenóide total	11,94 ± 4,64a	16,12 ± 1,24ab	29,94 ± 6,85b	23,16 ± 10,48ab
	Astaxantina livre	4,54 ± 2,56a	5,89 ± 0,45a	12,11 ± 3,28b	7,79 ± 1,70ab
	Ester de astaxantina	2,67 ± 0,66a	2,26 ± 1,08a	2,05 ± 1,92a	3,06 ± 0,46a
	Astaxantina total	7,21 ± 1,92a	8,14 ± 1,41ab	14,16 ± 3,64b	10,84 ± 1,56ab
28	Carotenóide total	13,39 ± 5,36a	15,02 ± 2,69a	30,36 ± 1,92b	29,00 ± 5,88b
	Astaxantina livre	4,09 ± 1,43a	5,31 ± 2,95a	15,38 ± 8,15a	11,81 ± 5,07a
	Ester de astaxantina	2,93 ± 0,99a	3,96 ± 1,61a	4,91 ± 6,94a	1,52 ± 2,63a
	Astaxantina total	7,02 ± 2,39a	9,27 ± 2,77a	20,29 ± 1,20b	13,33 ± 3,05ab

Resultados expressos como média (n = 3) ± DP. Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (ANOVA, teste Tukey, p < 0,05).

Comparativamente ao grupo controle, o teor de carotenóides totais do músculo e exoesqueleto aumentou cerca de 220% nos grupos suplementados com Hp, após 28 dias. A astaxantina total aumentou cerca de 170% no músculo, enquanto que no exoesqueleto este aumento foi de 290% para o grupo Hp e 190% para Lec/Hp.

Nossos resultados estão em concordância com vários estudos que mostram maior teor de carotenóides em camarões após a suplementação. Estes estudos utilizaram experimentos com tempo e/ou concentração de carotenóide maiores que o presente estudo, como 50 mg kg⁻¹ por 8 semanas (YAMADA et al., 1990), 100 mg kg⁻¹ por 4 semanas (YAMADA et al., 1990), 200 mg kg⁻¹ por 4 semanas (ARREDONDO-FIGUEROA et al., 2003) e 500 mg kg⁻¹ por 4 semanas (CHIEN; JENG, 1992). Passos (2006) analisou o efeito da suplementação com 100 mg kg⁻¹ de carotenóides (*H. pluvialis*) em *L. vannamei* e também não observou diferença no teor de carotenóides e astaxantina após 2 semanas (14 dias), mas a diferença foi observada em 3 semanas.

O teor de carotenóides totais e astaxantina foram maiores no exoesqueleto que no músculo em todos os grupos, assim como demonstrado por outros estudos (CHIEN; JENG, 1992, VERNON-CARTER et al., 1996, PASSOS, 2006, PAIBULKICHAKUL et al., 2008).

Cor dos camarões e Ordenação de preferência

Após 14 dias de experimento foram verificados poucas diferenças nos parâmetros de cor dos camarões frescos, sendo os camarões dos grupos suplementados com *H. pluvialis* mais avermelhados (maior valor de a*) que o grupo Lec, mas semelhante ao controle. Com 28 dias de experimento, esta diferença tornou-se mais evidente sendo os grupos suplementados com *H. pluvialis* mais avermelhados/alaranjados (maior valor de a* e h mais próximo de 90°) que o controle e Lec, estes mais esverdeados (menor valor de a* e h mais próximo de 180°) (Figura 1, Tabela 4).

Com o cozimento, os camarões dos grupos suplementados com *H. pluvialis* apresentaram-se mais avermelhados (h mais próximo de 0°) desde os 14 dias de suplementação. Após 28 dias, esta coloração mais avermelhada ficou mais intensa (maiores valores de a*, menores valores de h e menor valor de L*). Os grupos Controle e Lec apresentaram-se mais amarelados (h mais próximo de 90°) após 14 e 28 dias e mais claros (L* maior), após 28 dias de experimento (Fig. 1, Tabela 4).



Figura 1 Camarões frescos e cozidos alimentados com ração Controle (1), Lec (2), Hp (3) e Lec/Hp (4), por 28 dias.

Tabela 4 Parâmetros de cor de camarões frescos e cozidos alimentados com ração controle, Lec, Hp e Lec/Hp por 14 e 28 dias.

Dia	Parâmetros	Controle	Lec	Hp	Lec/Hp
Fresco (cru)					
14	Vermelho (a*)	-2,67 ± 0,27ab	-3,35 ± 0,26b	-1,90 ± 0,60 ^a	-1,74 ± 0,33a
	Amarelo (b*)	5,08 ± 1,08a	5,95 ± 1,16a	5,48 ± 0,62 ^a	5,21 ± 1,20a
	Hue (h)	118,15 ± 4,68a	119,87 ± 6,35a	108,80 ± 4,12a	108,99 ± 4,88a
	Luminosidade (L*)	38,09 ± 1,02a	36,78 ± 0,98a	37,56 ± 1,78a	37,32 ± 0,37a
28	Vermelho (a*)	-2,87 ± 0,18a	-2,63 ± 0,24a	-0,90 ± 0,77b	-1,23 ± 0,31b
	Amarelo (b*)	8,56 ± 1,18a	6,97 ± 1,10a	7,52 ± 0,75a	6,77 ± 1,08a
	Hue (h)	108,64 ± 1,42ab	111,03 ± 4,17b	97,11 ± 6,11a	100,25 ± 1,57a
	Luminosidade (L*)	36,10 ± 1,10a	35,02 ± 2,35a	35,38 ± 1,82a	35,14 ± 1,35a
Cozidos					
14	Vermelho (a*)	12,71 ± 0,28a	15,71 ± 1,54ab	17,27 ± 1,97b	15,00 ± 0,80ab
	Amarelo (b*)	29,03 ± 1,17a	32,95 ± 1,56b	29,28 ± 1,55a	26,18 ± 1,09a
	Hue (h)	66,34 ± 0,94a	64,55 ± 1,20a	59,53 ± 1,90b	60,20 ± 0,33b
	Luminosidade (L*)	69,29 ± 1,11a	66,91 ± 1,28a	67,56 ± 2,04a	66,67 ± 1,18a
28	Vermelho (a*)	17,45 ± 1,86ab	15,78 ± 1,58a	21,26 ± 2,66b	21,24 ± 1,11b
	Amarelo (b*)	34,35 ± 1,51a	32,17 ± 0,63a	32,43 ± 2,96a	31,32 ± 1,02a
	Hue (h)	63,09 ± 2,56a	63,91 ± 1,85a	56,81 ± 0,89b	55,87 ± 0,84b
	Luminosidade (L*)	68,77 ± 1,08a	66,96 ± 0,85a	65,82 ± 1,40b	65,34 ± 1,14b

Resultados expressos como média (n = 3) ± DP. Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (ANOVA, teste Tukey, p < 0.05).

Nos camarões *in natura* a astaxantina está ligada com proteínas formando o complexo caroteno-proteína, que apresenta coloração verde, azul ou púrpura e comprimento de onda de 580 nm. Com o cozimento, ocorre a quebra do complexo e a astaxantina livre revela sua coloração (amarela, laranja e vermelha) com comprimento de onda de 470-472 nm. Esta modificação no comprimento de onda é chamado efeito batocrômico (WEESIE et al., 1995; CIANCI et al., 2002).

Outros autores também observaram diferença na coloração dos camarões frescos alimentados com ração suplementada com carotenóides sendo estes mais marrom-escuro ou vermelho-marrom em comparação com camarões controle mais claros (BOONYARATPALIN et al., 2001; SUPAMATTAYA et al., 2005; PASSOS, 2006) e mais azulados (CHIEN; JENG, 1992). Esta coloração bem mais escura nos camarões crus mostrada por estes autores pode ser devido ao uso de maiores quantidades de carotenóides por períodos mais longos que o presente estudo. Estes autores não realizaram análise instrumental de cor semelhante ao presente estudo para comparação.

A cor dos camarões crus é muito importante por que os consumidores usam este atributo para comprar camarões frescos (ERICKSON et al., 2007). Erickson et al. (2007) também mostrou que após a estocagem os camarões crus aumentam a coloração escura. Esta informação é importante, pois a coloração mais avermelhada encontrada nos camarões suplementados com *H. pluvialis* pode influenciar negativamente a decisão de compra de camarões crus, se esta informação for confundida e não esclarecida aos consumidores.

Já com relação aos camarões cozidos, como desejado a coloração dos camarões suplementados com *H. pluvialis* após o cozimento foi mais avermelhada que os do grupo controle e Lec. Outros estudos mostram que a suplementação com carotenóides entre 100–300 ppm aumenta a pigmentação vermelha nos camarões após 4–8 semanas (YAMADA et al., 1990; VERNON-CARTER et al., 1996; BOONYARATPALIN et al., 2001; ARREDONDO-FIGUEROA et al., 2003; SUPAMATTAYA et al., 2005; PASSOS, 2006).

Entre os atributos sensoriais, a cor exerce grande influência no consumo de camarões (LATSCHA, 1989, BOONYARATPALIN et al., 2001, TAKAHASHI et al., 2008). A coloração dos camarões influencia diretamente a decisão de compra, já que representa o atributo sensorial prontamente disponível ao consumidor. As análises de preferência de cor são fundamentais para validar as estratégias de suplementação com carotenóides.

Na análise sensorial, os grupos Hp e Lec/Hp foram os preferidos pelos julgadores ($p<0,01$). Não foi observada diferença significativa na preferência entre os camarões dos grupos controle e Lec ($p<0,01$) e também entre os grupos Hp e Lec/Hp ($p<0,01$) (Tabela 5).

Tabela 5 Distribuição dos escores (%) de acordo com a preferência dos consumidores (n=30) com relação à cor dos camarões cozidos.

Escore	Controle	Lec	Hp	Lec/Hp
1	2 (6,6%)	2 (6,6%)	9 (30%)	17 (56,6%)
2	6 (10%)	6 (10%)	32 (53,3%)	16 (26,6%)
3	15 (16,6%)	63 (70%)	3 (3,3%)	9 (10%)
4	80 (66,6%)	16 (13,3%)	16 (13,3%)	8 (6,6%)
Soma	103a	87a	60b	50b

Valores na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p<0.05$). 1: amostra mais preferida; 2: intermediária mais preferida; 3: intermediária menos preferida; 4: amostra menos preferida. Soma de cada amostra = (1 x no. escores 1) + (2 x no. escores 2) + (3 x no. escores 3) + (4 x no. Escores 4).

Erickson et al. 2006 observaram que a aparência, cor e aroma são os principais atributos que influenciam na aceitabilidade do camarão cozido. Camarões mais avermelhados são associados a produto de melhor qualidade e frescor (BOONYARATPALIN et al., 2001), informação confirmada por Erickson et al. (2007) que avaliou os atributos sensoriais de camarões crus e cozidos e mostrou que após a estocagem os camarões crus aumentam a cor marrom e os cozidos diminuem a coloração vermelha. Além disso, também constatou que mais de 2/3 dos consumidores preferem comprar camarão fresco e não congelado.

Destacamos a importância de verificar se as estratégias de suplementação não irão influenciar negativamente a compra dos camarões frescos. Já a re-compra que é dependente das características do camarão cozido (ERICKSON et al., 2007), são muito favorecidas com a suplementação. É importante buscar estratégias de suplementação que garantam camarões mais vermelho/alaranjados após o cozimento, sem influenciar significativamente na coloração dos camarões crus, como observado com 14 dias de experimento.

Vários aspectos como espécie, estágio de desenvolvimento, ambiente, alimento e maturação sexual influenciam na composição

química dos camarões (SACHINDRA et al., 2005; LATSCHA, 1989, LIÑÁN-CABELLO et al., 2002, YANAR et al., 2004). Estes fatores reforçam a importância de avaliar a quantidade real de suplemento necessária para cada caso, já que o custo da suplementação é relativamente elevado e o excesso não é absorvido ou é posteriormente excretado ou catabolizado (CHIEN; JENG, 1992).

Vale destacar que embora os consumidores incluam critérios de qualidade na escolha dos camarões e relatem estar dispostos a pagar mais se o produto apresentar melhor qualidade, o preço é o principal fator na decisão de compra (ERICKSON et al., 2006).

No entanto, a procura por alimentos saudáveis contendo nutrientes bioativos como carotenóides tem aumentado no mundo todo. A adição de substâncias que melhoram os atributos sensoriais e o valor nutritivo dos alimentos tornam estes produtos mais atrativos aos consumidores, como observado no mercado de salmão com excelentes resultados (BAKER; GUNTHER, 2004).

Conclusões

Não foi observada nenhuma diferença entre os grupos Hp e Lec/Hp em todos os parâmetros analisados, demonstrando que para os camarões a adição de lecitina de soja não influencia no aproveitamento dos carotenóides adicionados na ração, nas condições descritas neste estudo.

A suplementação com 60 ppm de carotenóides de *H. pluvialis* por 28 dias aumenta o teor deste composto nos camarões e melhora a aceitabilidade dos camarões cozidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Roberto Bianchini Derner do Laboratório de microalgas (UFSC) pelo *H. pluvialis* e referencial teórico, Prof. Daniel Barrera-Arellano da Universidade Estadual de Campinas e Solae pela lecitina; todos os funcionários e estudantes dos Laboratórios de Camarões Marinhos e Nutrição Experimental (UFSC); CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos.

Referências

- APHA, 1989. Standard Methods for the Examination of Water and waste water. American Public Health Association ,Washington, USA, 1193pp.
- Arredondo-Figueroa, J.L., Pedroza-Islas, R., Ponce-Palafox, J.T., Vernon-Carter, E.J. 2003. Pigmentation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chili (*Capsicum annuum*) in comparison to astaxanthin. Rev. Mex. Ingen. Quim. 2, 101-108.
- Baker, R., Gunther, C. 2004. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. Trends Food Sci. Technol.15, 484–488.
- Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K., Britton, G., Schlipalius, L.E. 2001. Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus mondon*. Aquac. Res. 32, 182S-190S.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. FASEB J. 9, 1551-1558.
- Cianci, M., Rizkallah, P.J., Olczak, A., Raftery, J., Chayen, N.E., Zagalsky, P.F. 2002. The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: β -Crustacyanin at 3.2-Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 9795-9800.
- Chien, Y.H., Jeng, S.C. 1992. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. Aquaculture 102, 333-346.

- Chien, Y.H., Pan, C.H., Hunter, B. 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture* 216, 177–191.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P., Sorgeloos, P. 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155, 149-164.
- Erickson, M.C., Bulgarelil, M.A., Resurreccion, A.V.A., Vendetti, R.A., Gates, K.A. 2006. Consumer differentiation, acceptance, and demographic patterns to consumption of six varieties of shrimp. *J. Aquatic. Food Product. Technol.*, 15, 35-51.
- Erickson, M.C., Bulgarelli, M.A., Resurreiccion, A.V.A., Vendetti, R.A., Gates, K.A. 2007. Sensory differentiation of shrimp using a trained descriptive analysis panel. *LWT*, 40, 1774-1783.
- FAO, 2010. Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2008. Rome, *Food and Agriculture Organization*, 72pp.
- FAO, 2009. Fisheries and Aquaculture Department. The state of world fisheries and aquaculture 2008. Rome, *Food and Agriculture Organization*, 176pp.
- González-Félix, M.L., Lawrence, A.L., Gatlin, D.M., Perez-Velazquez, M. 2002. Growth, survival and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and absence of phospholipids. *Aquaculture* 205, 325– 343.
- Kalinowski, C.T., Robaina, L.E., Fernández-Palacios, H., Schuchardt, D., Izquierdo, M.S. 2005. Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. *Aquaculture* 244, 223-231.

Kumaraguru Vasagam, K.P., Ramesh, T.S., Balasubramanian, T. 2005. Dietary value of different vegetable oil in black tiger shrimp *Penaeus monodon* in the presence and absence of soy lecithin supplementation: Effect on growth, nutrient digestibility and body composition. *Aquaculture* 250, 317– 327.

Latscha, T. 1989. The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. *Adv. Trop. Aquacult.* 9, 319-325.

Liñán-Cabello, M.A. Paniagua-Michel, J. Zenteno-Savín, T. 2003. Carotenoids and retinal levels in captive and wild shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nutr.* 9, 383-389.

McNulty, H., Jacob, R.F., Mason, R.P. 2008. Biologic Activity of Carotenoids Related to Distinct Membrane. *Physicochemical Interactions. Am. J. Cardiol.* 101, 20-29.

Niu, J., Tian, L.X., Liu, Y.J., Yang, H.J., Ye, C.X., Gao, W. 2009. Effect of dietary astaxanthin on growth, survival, and stress tolerance of postlarval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Society* 40, 795-802.

Nonwachai, T., Purivirojkul, W., Limsuwan, C., Chuchird, N., Velasco, M., Dhar, A.K. 2010. Growth, nonspecific immune characteristics, and survival upon challenge with *Vibrio harveyi* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) raised on diets containing algal meal. *Fish Shellfish Immunol.*, 29, 298-304.

Palozza, P., Barone, E., Mancuso, C., Picci, N. 2008. The protective role of carotenoids against 7-keto-cholesterol formation in solution. *Mol. Cell. Biochem.* 309, 61–68.

- Pan, C.H., Chein, Y.H., Hunter, B. 2003. The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 297, 107–118.
- Passos, R. 2006. Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para aquicultura. PhD dissertation, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC. Available at: <http://www.bu.ufsc.br>. Accessed Jan. 20, 2011.
- Paibulkichakul, C., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P., Menasveta, P. 2008. Improved maturation of pond-reared, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using fish oil and astaxanthin feed supplements. Aquaculture 282, 83-89.
- Re-Araujo, A.D., Ruiz, M.J.A. 2003. Ensayo de diferentes lecitinas em la dieta de juveniles de *Penaeus vannamei* (Crustácea: Decapoda). Ver. Biol. Trop. 51, 743-747.
- Sachindra, N.M., Bhaskar, N., Mahendrakar, N.S. 2005. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. J. Sci. Food Agric. 85, 167–172.
- Supamattayaa, K., Kiriratnikoma, S., Boonyaratpalin, M. & Borowitzka, L. 2005. Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 248, 207– 216.
- Takahashi, N.S. Tsukamoto, R.Y., Tabata, Y., Rigolino, M.G. 2008. Truta salmonada. Processo produtivo em constante aprimoramento no Brasil. Panor. Aquicult., 18, 28-33.

Tume, R.K., Sikes, A.L., Tabrett, S., Smith, D.M. 2009. Effect of background color on the distribution of astaxanthin in black tiger prawn (*Penaeus monodon*): Effective method for improvement of cooked color. *Aquaculture* 296, 129–135.

Tolasa, S., Cakli, S., Ostermeyer, U. 2005. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. *Eur. Food Res. Technol.* 221, 787-791.

Vernon-Carter, E.J., Ponce-Palafox, J.T., Pedroza-Islas, R. 1996. Pigmentation of Pacific white shrimps (*Penaeus vannamei*) using Aztec marigold (*Tagetes erecta*) extracts as the carotenoid source. *ALAN* 46, 243-246.

Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M. & Ito, Y. 1990. Pigmentation of Prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids I. Effect of dietary astaxanthin, β -carotene and canthaxanthin on pigmentation. *Aquaculture* 87, 323-330.

Yanar, Y., Çelik, M., Yanar, M. 2004. Seasonal changes in total carotenoid contents of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* and *Metapenaeus conoceros*) inhabiting the eastern Mediterranean. *Food Chem.* 88, 267-269.

You, K., Yang, H., Liu, Y., Liu S., Zhou, Y. Zhang, T. 2006 Effects of different light sources and illumination methods on growth and body color of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 252, 557– 565.

Weesie, R.J., Askin, D., Jansen, F.J.H.M., Groot, H.J.M., Lugtenburg, J. & Britton, G. 1995. Protein-chromophore interactions in α -crustacyanin, the major blue carotenoprotein from the carapace of the lobster, *Homarus gammarus* a study by ^{13}C magic angle spinning NMR. *FEBS Lett.* 362, 34-38.

Considerações importantes

Os dois artigos apresentados neste capítulo mostram que a suplementação com 60 ppm de carotenóides de *H. pluvialis* torna os camarões mais pigmentados.

Foram observadas algumas diferenças nos resultados entre os dois estudos. Com relação ao ganho de peso e sobrevivência, somente no experimento 2.1 foi observado melhores resultados com a suplementação de carotenóides. Quanto ao teor de carotenóides totais e astaxantina acumulados pelos camarões após 14 dias, observa-se que no experimento 2.1 ocorreu um acúmulo maior que no experimento 2.2, após 14 dias de tratamento.

Sabe-se que muitos fatores interferem no metabolismo dos animais, logo podemos observar que o experimento mostrado no primeiro artigo (2.1) foi realizado com camarões com menor peso e mais jovens ($7,87 \pm 0,6$ g) que os do artigo 2.2 ($13,8 \pm 1,1$ g). Os camarões menores respondem de maneira mais intensa a suplementação com carotenóides (MARTINEZ-CÓRDOVA et al., 2002; SUPAMATTAYA et al., 2005) e lecitina de soja (D'ABRAMO, 1998) além de estarem em uma fase do desenvolvimento que caracteriza-se pelo ganho de peso mais rápido.

Além disso, embora as condições dos dois experimentos fossem semelhantes e consideradas adequadas, o experimento 2.1 apresentou maior densidade de animais por tanque ($0,1$ camarão/ m^3 ; $0,01$ camarão/ m^3) e a renovação da água era realizada uma vez ao dia e não de maneira contínua, como no experimento 2.2. Além da diferença de tamanho, as diferenças na densidade, variação dos parâmetros da água antes e após a troca e agitação física pelo manejo podem ter gerado algum nível de estresse nos animais do artigo 2.1, interferido na sua fisiologia e na resposta à suplementação.

Martinez-Córdova et al. (2002) observaram que quanto mais jovens os camarões maior o benefício dos carotenóides em termos de sobrevivência e ganho de peso. Também observaram que para camarões adultos, a adição de carotenóides auxiliou na melhoria da taxa de sobrevivência nas fazendas, onde as condições são mais adversas que em laboratório. Chien et al. (2003) demonstram que os camarões juvenis respondem melhor ao estresse com a suplementação de carotenóides.

Estes apontamentos podem justificar as pequenas diferenças observadas nos resultados dos estudos. Vale salientar que a busca por estratégias de pigmentação que resultem em camarões mais

vermelho/alaranjados após o cozimento, sem influenciar significativamente na coloração dos camarões crus, como observado com 14 dias de experimento devem ser priorizadas para atender a demanda dos consumidores.

Referências inclusas no Capítulo 1.

CAPÍTULO 3 – PREFERÊNCIA DOS CONSUMIDORES COM RELAÇÃO À COLORAÇÃO DE CAMARÕES

Considerando o objetivo final de produzir camarões com características de cor mais atrativas aos consumidores, neste capítulo avaliamos a preferência dos consumidores com relação à coloração dos camarões.

No item 3.1 avaliamos a preferência de consumidores com relação à coloração de camarões suplementados com carotenóides, crus e cozidos. O artigo apresentado no item 3.2 buscou investigar o teor de carotenóides nos camarões comercializados em Florianópolis para avaliar a quantidade ingerida pelos consumidores e a preferência de cor dos camarões cozidos pelos consumidores locais.

3.1 Preferência dos consumidores com relação à coloração de camarões crus e cozidos

Este artigo foi enviado para publicação no International Journal of Food Science and Technology e está apresentado conforme as normas de publicação do referido periódico.

Preference Ranking of Color in Raw and Cooked Shrimp

Preference Ranking of Shrimp Color

Jane Parisenti, Luiz Henrique Beirão, Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte, Fabiana Ourique, Camila Cristina da Silveira Brito, Caroline Camila Moreira

Abstract

The aim of this work was to analyze consumer preference regarding color in raw and cooked shrimp. Farmed shrimp *Litopenaeus vannamei* ($13.8 \pm 1.16g$) was fed with Control or Supplemented food (60ppm of carotenoids). The shrimp samples were analyzed in naked eye, confirmed by colorimetry and sorted in the following categories: Dark gray ($L^* 27.99$; $h 168.16$), Gray ($L^* 32.58$; $h 124.60$), and Light gray ($L^* 36.2$; $h 119.35$) for raw shrimp, and Intense Orange ($L^* 61.49$;

h 54.69), Orange (L* 65.97; h 57.79) and Light orange (L* 72.65; h 70.17) for cooked shrimp. A preference-ranking test was performed with 35 judges invited to rank the samples in descending order of preference. Consumers prefer light raw shrimp (Light gray and Gray) and brightly orange cooked shrimp (Orange and Intense Orange). These results indicate a challenge for the shrimp industry, as the lightest raw shrimp is also not so brightly orange-colored after cooking.

Keywords: pigmentation, raw shrimp, cooked shrimp, preference-ranking test, *Litopenaeus vannamei*.

Introduction

Shrimp has been widely enjoyed mainly due to its sensory properties and nutritional value. Its reddish color, which has been associated with its high quality, is one of the major factors responsible for its acceptability, for which astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) is responsible – a carotenoid also present in salmonids (Boonyaratpalin *et al.* 2001). Shrimp with brightly red color has better prices and market consumer acceptance (Latscha 1989; Tume *et al.* 2009).

Shrimp is the aquaculture product with the most representative international economy, accounting for 15.4% of the total fishery products traded internationally in 2008 (FAO 2010). In order to meet such demand, shrimp farms have been growing at the expense of fishing. According to FAO (2009) 70% of shrimp sold is produced on shrimp farms. With this information, white shrimp *Litopenaeus vannamei* (*L. vannamei*) has become the aquatic species most farmed throughout the globe (FAO 2010).

Farmed shrimp should be fed with carotenoid-supplemented food in order to acquire the signature color of wild shrimp, which feed on krill, microalgae, and phytoplankton present in the environment. Several studies have attempted to determine the best supplementation strategy to produce more strongly pigmented shrimp (Arredondo-Figueroa 2003; Boonyaratpalin *et al.* 2001; Yamada *et al.* 1990; Passos, 2006; Chien and Jeng 1992), but such studies generally do not perform preference ranking tests, as regards to the color obtained with such practices.

The aim of this research was to analyze consumer preference regarding color in raw and cooked shrimp.

Materials and methods

Samples

L. vannamei shrimp (Boone 1931), also known as the Pacific white shrimp ($13.8 \pm 1.16\text{g}$) farmed in the shrimp laboratory (*Laboratório de Camarões Marinhos* -LCM) at Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, in Florianópolis, Southern Brazil. Shrimp fed with Control or Supplemented food (60 ppm of *Haematococcus pluvialis* carotenoids) as described in Parisenti *et al.* (2011), sorted by color difference visible to the naked eye, and confirmed by colorimetric analysis described in section 2.2. 18 raw shrimp were selected for analysis (6 light-colored, 6 medium-colored, and 6 dark-colored shrimp) and other 18 cooked shrimp were selected under the same criteria. Shrimp was collected and kept in ice for immediate color evaluation.

Colorimetric analysis

Shrimp color was determined for Raw and Cooked groups (1 min, 100 ml water at 100°C) using a Minolta Chromo Meter CR 400 (Osaka, Japan) colorimeter calibrated on a white reference plate before use. Measurements were taken from the shrimp left side on three parts along the shrimp body (closest to head; mid-section; close to tail) and performed in the colorimetric space L^* (lightness), a^* (redness), b^* (yellowness) (CIELab system), at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. From a^* and b^* values, hue (overall color) was calculated, as explained in Kalinowski *et al.* (2005). After color analysis, shrimp among the previously selected was separated by presenting a more significant difference in color and sorted as Light gray, Gray, and Dark gray for raw shrimp; and Light Orange, Orange and Intense Orange for cooked shrimp.

Sensory analysis

A preference-ranking test was performed with 35 judges of both sexes, ranging from 20 to 69 years of age. Judges were selected based on criteria of being shrimp consumers, and a sensorial test was carried out at the UFSC dietetic technique laboratory (*Laboratório de Técnica Dietética*). The color preference of raw and cooked shrimp was evaluated.

After instrumental color analyses, three samples of raw shrimp were shown to the judges and three samples of cooked shrimp were shown in a later stage. The samples were served on white dishes and were named with random three-digit numbers.

Consumers were invited to rank the samples in descending order of preference. For raw shrimp, the sensory analysis chart presented the message “Rate the most preferred sample scoring 1 and the least preferred sample scoring 3, based on your intention of purchase”. For cooked shrimp the message was “Rate the most preferred sample scoring 1 and the least preferred sample scoring 3, based on shrimp color preference.”

Finally, we have calculated the sum of preference orders and established a significant difference in preference among the samples.

Statistical analysis

Colorimetric analysis data was analyzed by one-way variance analysis (ANOVA) and Tukey’s test ($p < 0.05$). The results of sensory analysis were analyzed by nonparametric Friedman’s test ($p < 0.05$). Statistical analyses were carried out using the BioEstat 5.0 statistical software.

Results and discussion

Shrimp used in preference-ranking test has shown instrumental color difference among the samples, therefore confirming the difference observed in naked eye (Figure 1). For raw shrimp, the Dark gray color was confirmed by presenting lower L^* (darker), a^* (greener) and b^* (bluer) values, in comparison to Light gray with higher L^* (lighter), a^* (less green) and b^* (yellower). Dark gray shrimp presented h closer to 180° , indicating a greener shade in comparison to the yellower Light gray shrimp (h closer to 90°) values, visible in Table 1.



Figure 1 Raw and cooked shrimp utilized in preference-ranking test (Cooked shrimp (a): 581 Light orange, 299 Orange, 789 Intense orange; Raw shrimp (b): 232 Light gray, 325 Gray, 598 Dark gray). Figure 1 is not part of the original paper.

Table 1 L*, a*, b* and h color parameters from shrimp preference analyses. Mean values in the same column followed by different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

Raw	L*	a*	b*	h
Dark gray	27.99 ± 1.32^a	-3.91 ± 0.95^a	0.81 ± 1.65^a	168.16 ± 25.81^a
Gray	32.58 ± 1.26^{ab}	-3.63 ± 0.60^a	5.80 ± 2.59^a	124.60 ± 11.87^{ab}
Light gray	36.2 ± 4.17^b	-2.54 ± 0.89^a	4.90 ± 1.82^a	119.35 ± 13.76^b
Cooked				
Intense orange	61.49 ± 0.56^a	27.25 ± 3.90^a	38.34 ± 3.67^a	54.69 ± 1.24^a
Orange	65.97 ± 2.83^{ab}	18.62 ± 1.45^b	29.58 ± 2.55^b	57.79 ± 0.70^b
Light orange	72.65 ± 1.14^b	8.44 ± 0.94^c	23.38 ± 2.09^b	70.17 ± 0.62^c

Mean values in the same line followed by different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

After cooking, the highest a* and b* values for Intense Orange shrimp confirm its being more reddish/yellow than Light Orange

shrimp, with lower values for these parameters. The lower L* value for Intense Orange shrimp also shows that this color is brighter when compared to the others (Table 1).

The shrimp raw color is due to the accumulation of crustacyanin, a protein-astaxanthin complex formed by the protein-astaxanthin bond. This complex is colored between green, blue, and purple and has a wavelength of 580nm (Weesie *et al.* 1995; Cianci *et al.* 2002). Therefore, the greater the amounts of astaxanthin present in shrimp, the darker its color.

After cooking, the complex is dissociated and free astaxanthin reveals its color, between yellow, orange, and red which has a wavelength of 470-472nm (Weesie *et al.* 1995; Cianci *et al.* 2002).

This color change, caused by the formation or dissociation of the complex is due to the bathochromic shift (a change in the wavelength absorbed by compounds) (Weesie *et al.* 1995; Cianci *et al.* 2002). This effect is biologically important as the change in shell color is an essential mechanism of camouflage for defense strategies against predators (Latscha 1989).

Fresh, different colors of shrimp are found, depending on its species, feeding, and its accumulated amount of carotenoids (Erickson *et al.* 2007; Yanar *et al.* 2004). Several studies have shown that carotenoid supplementation results in darker raw shrimp (brown) and reddish cooked shrimp, in comparison to shrimp fed without such compounds (Boonyaratpalin *et al.*, 2001; Supamattayaa *et al.* 2005; Passos 2006; Chien and Jeng 1992).

The preference analysis indicates that consumers prefer Light gray and Gray raw shrimp, and Orange and Intense orange cooked shrimp. These results are very evident, according to the values shown in Table 2. Light gray shrimp is highly regarded (74.3% approval), and similarly Dark gray shrimp is noticeably the least preferred (91.4% rejection). Regarding the cooked shrimp, the Orange shrimp is preferred (54.3% approval), and the Light orange presents high rejection with 88.6%.

Table 2 Distribution of scores (%) according to the preference of consumers (n=35) in the sensory analysis of shrimp color.

Scores	Raw			Cooked		
	Light Gray	Gray	Dark Gray	Light Orange	Orange	Intense Orange
1	26 (74.3%)	7 (20%)	2 (5.7%)	2 (5.7%)	19 (54.3%)	14 (40%)
2	6 (17.1%)	28 (80%)	1 (2.9%)	2 (5.7%)	14 (40%)	19 (54.3%)
3	3 (8.6%)	0	32 (91.4%)	31 (88.6%)	2 (5.7%)	2 (5.7%)
Sum of orders	47 ^a	63 ^a	100 ^b	99 ^a	53 ^b	58 ^b

Mean values in the same line followed by different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$). 1: most preferred sample; 2: intermediate; 3: least preferred sample. Sum of orders of each sample = (1 x no. scores 1) + (2 x no. scores 2) + (3 x no. scores 3).

Shrimp color influences the decision of purchase directly, since it represents the sensory attribute which is readily available to consumers (Latscha 1989; Boonyaratpalin *et al.* 2001; Takahashi *et al.* 2008). While attributes such as color and the appearance of raw shrimp are used as purchase criteria, the final criterion for acceptance and repurchase is based on its features when cooked (Erickson *et al.* 2007). However, the results of the present study indicate that consumers do not relate raw shrimp color attributes with cooked shrimp color attributes, since the darker raw shrimp makes the most brightly orange-colored cooked shrimp.

Also, 2/3 consumers prefer to buy raw shrimp (Erickson *et al.* 2007) which acquires a brown shade after storage. This information is important because the red and dark color seen in supplemented-fed shrimp may influence negatively in the purchase of such raw shrimp, if this information is confusing and never explained to the consumer. The color preference analyses are fundamental in order to validate carotenoid supplementation strategies.

For cooked shrimp, the reddish-orange shrimp color is associated with its quality as a product (Latscha 1989; Boonyaratpalin *et al.* 2001), which is confirmed by the consumer preference for more pigmented shrimp. It is also important to note that with storage cooked shrimp loses a great deal of its pigmentation (Erickson *et al.* 2007).

Adding colorants in foods to improve their appearance and to increase consumer attractiveness is a widely used strategy. Consumers seek particularly for safe and healthy colorants (Baker and Günther 2004). For farmed shrimp, pigmentation strategies in order to ensure higher acceptance for cooked shrimp are necessary to prevent diseases such as the blue shrimp syndrome (Latscha 1989) as well as for many biological functions (Britton 1995) and protecting antioxidant compounds susceptible to oxidation as unsaturated fatty acids and cholesterol (Paloza *et al.* 2008; McNulty *et al.* 2008; Cabrera *et al.* 1999).

Also, shrimp presents excellent composition in minerals, proteins and low lipid content, especially when prepared appropriately (Freygang 2007; Musaiger and D'Souza 2008), and the presence of carotenoids in more pigmented shrimp make this food satisfactory in diets, enhancing the intake of healthy compounds.

To our knowledge, this is the first study reporting color preferences for raw shrimp. Consumers prefer lighter raw shrimp, which indicates that supplementing shrimp food for pigmentation should be followed by marketing strategies to inform consumers and therefore

improve its acceptance. This is important due to the fact that the majority of shrimp is commercialized raw or to be sold cooked, where strong pigmentation has a higher level of preference.

References

Arredondo-Figueroa, J.L., Pedroza-Islas, R., Ponce-Palafox, J.T. & Vernon-Carter, E.J. (2003). Pigmentation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chili (*Capsicum annuum*) in comparison to astaxanthin. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*, **2**, 101-108.

Baker, R. & Gunther, C. (2004). The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science and Technology*, **15**, 484–488.

Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K., Britton, G. & Schlipalius, L.E. (2001). Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*, **32**, 182S-190S.

Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, **9**, 1551-1558.

Cabrera, T., Cabrera G. & Rosas, J. (2005). Variación de lípidos y ácidos grasos en camarones marinos consumidos en Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **55**, 194-200.

Cianci, M., Rizkallah, P.J., Olczak, A., Raftery, J., Chayen, N.E. & Zagalsky, P.F. (2002). The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: β -Rawstacyanin at 3.2-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 9795-9800.

Chien, Y.H. & Jeng, S.C. (1992). Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. *Aquaculture*, **102**, 333-346.

Erickson, M.C., Bulgarelil, M.A., Resurreccion, A.V.A., Vendetti, R.A. & Gates, K.A. (2007). Consumer differentiation, acceptance, and demographic patterns to consumption of six varieties of shrimp. *J. Aquatic. Food Product and Technology*, **15**, 35 – 51.

FAO. (2010). Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2008. Rome, Food and Agriculture Organization, 72pp.

FAO. (2009). Fisheries and Aquaculture Department. The state of world fisheries and aquaculture 2008. Rome, Food and Agriculture Organization, 176pp.

Freygang, J. (2007). Determinação do colesterol e ácidos graxos em shrimps (*Litopenaeus vannamei*) cultivados na região de Santa Catarina e efeito do seu consumo no perfil lipídico de ratos (*Rattus norvegicus*). PhD dissertation Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC. Available at: <http://www.bu.ufsc.br>. Accessed Jan. 20, 2011.

Latscha, T. (1989). The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. *Advances in Tropical Aquaculture*, **9**, 319-325.

McNulty, H., Jacob, R.F. & Mason, R.P. (2008). Biologic Activity of Carotenoids Related to Distinct Membrane. Physicochemical Interactions. *American Journal of Cardiology*, **101**, 20-29.

Musaiger, A.O. & D'Souza, R. (2008). The effects of different methods of cooking on proximate, mineral and heavy metal composition of fish and shrimps consumed in the Arabian Gulf. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **58**, 103-109.

Palozza, P., Barone, E., Mancuso, C. & Picci, N. (2008). The protective role of carotenoids against 7-keto-cholesterol formation in solution. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **309**, 61–68.

Parisenti, J., Beirão, L.H., Maraschin, M., Mouriño, J.L., Vieira, F.N., Bedin, L.H. & Rodrigues, E. (2011). Pigmentation and carotenoid content of shrimp fed with *Haematococcus pluvialis* and soy lecithin. *Aquaculture Nutrition*, **17**, e530-e535.

Passos, R. (2006). Extração e caracterização química de carotenoides provenientes de biomassas de interesse para aquicultura. PhD dissertation, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC. Available at: <http://www.bu.ufsc.br>. Accessed Jan. 20, 2011.

Supamattayaa, K., Kiriratnikoma, S., Boonyaratpalin, M. & Borowitzka, L. (2005). Effect of a Dunaliella extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, **248**, 207–216.

Takahashi, N.S. Tsukamoto, R.Y., Tabata, Y. & Rigolino, M.G. (2008). Truta salmonada. Processo produtivo em constante aprimoramento no Brasil. *Panorama da Aquicultura*, **18**, 28-33.

Tume, R.K., Sikes, A.L., Tabrett, S. & Smith, D.M. (2009). Effect of background color on the distribution of astaxanthin in black tiger prawn (*Penaeus monodon*): Effective method for improvement of cooked color. *Aquaculture*, **296**, 129–135.

Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M. & Ito, Y. (1990). Pigmentation of Prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids I. Effect of dietary astaxanthin, β -carotene and canthaxanthin on pigmentation. *Aquaculture*, **87**, 323-330.

Yanar, Y., Çelik, M. & Yanar, M. (2004). Seasonal changes in total carotenoid contents of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* and *Metapenaeus conoceros*) inhabiting the eastern Mediterranean. Food Chemistry, **88**, 267-269.

Weesie, R.J., Askin, D., Jansen, F.J.H.M., Groot, H.J.M., Lugtenburg, J. & Britton, G. (1995). Protein-chromophore interactions in α -rawstacyanin, the major blue carotenoprotein from the carapace of the lobster, *Homarus gammarus* a study by ^{13}C magic angle spinning NMR. FEBS Letters, **362**, 34-38.

3.2 Teor de carotenóides totais de camarões comercializados em Florianópolis/SC e preferência de coloração por consumidores

Este artigo foi enviado para publicação na Revista Alimentos e Nutrição e está apresentado conforme as normas de publicação do referido periódico.

Total carotenoids content of shrimp commercialized in Florianopolis/SC and color preference for consumers

Jane PARISENTI, Camila Cristina da Silveira BRITO, Vera Lúcia Cardoso Garcia TRAMONTE, Luiz Henrique BEIRÃO, Caroline Camila MOREIRA, Fabiana OURIQUE

Short title: Carotenoid content and color of shrimp

Abstract

The aim of this work was to evaluate total carotenoids content in shrimp commercialized in Florianopolis, SC, Brazil and to analyze consumers' preference regarding to shrimp color. Samples of frozen (7) and fresh (7) shrimp from cultivation farms were obtained from fish market and public market. Total carotenoid content of shrimp muscle were extracted three times with acetone. Then, total carotenoids were concentrated in hexane and measured in spectrophotometer at 470nm. Results were calculated according to the standard curve of astaxanthin. Two samples presenting the highest and the lowest total carotenoids content were selected for sensorial analysis (30 consumers), which were analyzed in colorimeter in order to confirm color differences observed visually. Total carotenoids content for fresh and frozen shrimp was 0.44 ± 0.23 mg% and 0.48 ± 0.24 mg%, respectively. Regarding to consumers' preference, 90% chose intense red-like color sample (a^* 17.0 and b^* 31.3) rather than light-colored sample and low total carotenoid (a^* 4.6 and b^* 14.8). Pigmented shrimp are preferred by consumers and its consumption enhances carotenoids in taking, especially astaxanthin.

Key-words: shrimp, carotenoid, astaxanthin, consumer' preference

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a quantidade de carotenóides totais nos camarões comercializados em Florianópolis, SC, Brasil e verificar a preferência dos consumidores com relação à cor dos camarões. Foram adquiridas sete amostras de camarões frescos e sete amostras de camarões congelados provenientes de fazendas de cultivo e comercializados em peixarias e no mercado público municipal de Florianópolis. Os carotenóides totais do músculo dos camarões foram extraídos por três vezes com acetona, concentrados em hexano e a leitura realizada em espectrofotômetro a 470nm. Os teores de carotenóides totais foram calculados de acordo com a curva padrão de astaxantina. A amostra com maior e a com menor teor de carotenóides totais foram selecionadas para análise sensorial (30 consumidores de camarões) e analisadas em calorímetro para verificar a diferença de cor observada. Foram encontrados teores de carotenóides totais de $0,44 \pm 0,23$ mg% para camarões frescos e $0,48 \pm 0,24$ mg% para congelados. Com relação à preferência dos consumidores, 90% dos julgadores preferiram a amostra com coloração laranja mais intensa (a^* 17,0 e b^* 31,3) em relação à amostra com coloração mais clara e menor teor de carotenóides totais (a^* 4,6 e b^* 14,8). Os camarões mais pigmentados são preferidos pelos consumidores e seu consumo favorece a ingestão de carotenóides, principalmente a astaxantina.

Palavras-chave: camarão, carotenóides, astaxantina, preferência do consumidor.

Introduction

Healthy food containing bioactive nutrients as carotenoids, which present beneficial effects to health, has increased worldwide. Among carotenoids, astaxanthin has been highlighted due to its antioxidant activity, higher than β -carotene as well as C vitamin and tocopherol.^{23,24}

Present in some kinds of trout, salmon and shrimp, astaxanthin is the major carotenoid, responsible for red-like color of these foods.^{4,17}

For native shrimps and fishes, astaxanthin is obtained from microalgae present in the environment, while for cultivated shrimps it must be added to feeding.^{4,32} Feeding supplemented with astaxanthin for cultivated shrimps provides several beneficial effects on its development^{4,8,18} and enhances consumption, once this preference is related to red-like color.^{4,29} Shrimps represent 7% of fish commercialized worldwide, being 70% from cultivation farm.⁹

Studies have demonstrated astaxanthin is related to prevention and/or treatment human diseases like diabetes,²⁰ cancer,^{3,7} skin,¹⁹ hypertension,¹³ cardiovascular,^{25,27} neurodegenerative,¹¹ and ocular²³ diseases.

Besides being one of the few food sources of astaxanthin available for human consumption,¹⁴ shrimp presents other nutrients like proteins of high biological value and low lipid content,¹⁰ being available in several regions and of economical importance. For this reason, and because of available data are from experimental studies mainly using samples not available for consumption, carotenoids content data of commercialized shrimps are needed.

The aim of this work was to evaluate total carotenoids content in shrimp commercialized in Florianopolis, SC, Brazil and to analyze consumers' preference regarding to shrimp color.

Material and methods

Seven samples of frozen cultivated shrimps (muscle) and seven samples of fresh cultivated shrimps (whole) were chosen randomly from fish markets and public marked of Florianopolis/SC, the samples were analyzed from February to April 2009. Three samples (packets) of 1 kg of shrimp were bought for each sample. Only the edible portion was used for analysis.

Extraction of carotenoids was determined according to Tolasa *et al.*³⁰ with some modifications. 500 g of raw shrimp muscle was ground and blended for 1 min. Eight grams of homogenized past were extracted three times with 30 ml of acetone. Each acetone extract was collected in separating funnel. 25 ml hexane, 100 ml water, and 0.5 g NaCl were added for separating water soluble compounds. Funnels were kept in dark for 20 min and shaken once. Hexane extract was filtered and dehydrated by anhydrous sodium sulfate and poured in volumetric flask (25 ml). Total carotenoid concentration was determined spectrophotometrically (spectrophotometer Shimadzu LC-10) at 470 nm and calculated according to a standard curve ($y = 0,1847x$, $r^2 = 0,9951$) of astaxanthin (Sigma, 98%). Analyses were performed in triplicate.

Samples of lower and of higher carotenoids content and visual color differences were selected to analyze shrimp color consumers' preference. Reading of these two samples with colorimeter (Minolta Chromo Meter CR 400, Osaka, Japan) calibrated on a white reference plate before using were carried out in order to confirm this visual color

difference. Measurements were taken from three parts along the shrimp muscle (closest to head; middle; close to tail) and performed in the colorimetric space L^* , a^* , b^* (CIE Lab system), at $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Sensorial test was carried out by thirty judges (shrimp consumers) at Dietetic Technique Laboratory, Federal University of Santa Catarina. The two samples of shrimps muscle (same size) were cooked in boiling water for 3 minutes, placed in white plates and labeled with three digits for simultaneous presentation to judges. Each judge received a form to check, after visualization, the preferred sample regarding to color.

Statistical Analyzes

Experimental data were submitted to test t ($p < 0.05$), using BioEstat 5.0. Results were expressed as mean \pm standard deviation.

Results

Frozen and fresh shrimps total carotenoids content were, respectively, $0.48 \text{ mg}\% \pm 0.24$ and $0.44 \text{ mg}\% \pm 0.23$, not presenting significant statistical difference between fresh and frozen.

Color instrumental analyzes of the two samples of shrimps used in sensorial analyzes confirmed visual color difference (Fig. 1). Significant difference was found ($p < 0.001$) for parameters a^* e b^* (Table 1).



Figura 1 Cooked shrimp utilized in sensorial test (832 highest total carotenoids shrimp and, 425 lowest total carotenoids shrimp). Figura não apresentada no artigo original.

Table 1 Total carotenoids (mg%) and color parameters L*, a*, e b* for samples and shrimps from analyzes of preference.

Sample	CT (mg%)	L*	a*	b*
832	0.50 ± 0.02 ^a	67.30 ± 1.4	17.0 ± 2.5 ^a	31.3 ± 1.7 ^a
425	0.19 ± 0.01 ^b	69.35 ± 1.5	4.6 ± 1.7 ^b	14.8 ± 1.9 ^b

M + SD. Mean presenting different letters in column are significant different (test t, com p<0,05). CT: total carotenoids.

Intense red-like color sample (832) was preferred by 90% of consumers, rather than light-colored sample (425).

Discussion

Total carotenoid content found in shrimp samples commercialized in Florianopolis are close the lower values reported in the literature for experimental shrimps fed with no carotenoids and for wild shrimps. For different species, values of 0.1 mg% a 4.67 mg% were found.^{8,12,26,28,32,33} Several aspects as specie, stage of development, environment and, mainly food, influence shrimps chemical composition.^{17,33} Thus, variability is expected in carotenoid content between samples (according to standard deviation) and in comparison to literature. This variability shows the need of regional food analyzes and database planning for each country or region.

Relation between color and total carotenoids observed in samples 832 and 425 is in agreement with other works, showing intense red-like color of cooked shrimps is related to high total carotenoids content and astaxanthin.^{1,4,26,28} Thus, pigmented shrimp preference indicates higher carotenoids consumption, which is a positive effect due to their several beneficial properties.

Substances addition which enhances sensorial qualities and also food nutritive value make these products more attractive for consumers, as observed in salmon market with excellent results.²

Among sensorial features, color has been of great influence in shrimp consumption.^{4,17,29} Feeding supplemented with astaxanthin or other carotenoid shrimp may increase pigmentation in cultivated shrimp. Besides enhancing color, supplementation may increase three to four times total carotenoid content in shrimp muscles.^{8,28} In addition, in

regions where whole shrimps (with exoskeleton) are consumed, once carotenoids content may be five to nine times higher in exoskeleton and head than in muscle.^{1,31}

Although the ideal amount of marine carotenoids is not determined, its several benefits are well reported in the literature, enhancing the importance of consuming these compounds.^{3,7,11,19,20,23,24,25,27}

Salmon and some kinds of trout are another important source of marine carotenoids. Wild and cultivated salmon present total carotenoids content ranging from 0.55 to 0.64 mg% and 0.77 to 0.84 mg%, respectively, as well as shrimps being astaxanthin the main carotenoids.¹⁵

Besides pigmentation, presence of astaxanthin in shrimps is important in protecting compounds susceptible to oxidation^{21,24} present in shrimp as unsaturated fatty acids^{6,10} and cholesterol.¹⁰ Studies indicate cholesterol oxide produced *in vivo* and taken through food as one of the potential factors for developing atherosclerosis and cardiac troubles.^{4,16,24}

Once shrimps present excellent composition in minerals, proteins and low lipids content, especially when prepared with appropriated methods,^{10,22} presence of carotenoids in more pigmented shrimps make this food satisfactory in diets, enhancing healthy compounds consumption.

References

1. ARREDONDO-FIGUEROA, J.L. et al. Pigmentation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chili (*Capsicum annuum*) in comparison to astaxanthin. **Rev Mex Ingen Quim.**, v.2, p.101-108, 2003.
2. BAKER, R.; GUNTHER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trends Food Sci Technol.**, v.15, p.484–488, 2004.

3. BERTRAM, J.S.; VINE, A.L. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target. **Bioch. Bioph. Acta.**, v.1740, p.170-178, 2005.
4. BOONYARATPALIN, M. et al. Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. **Aquaculture Res.**, v.32(sup.1), p.182-190, 2001.
5. BROWN, A.J.; JESSUP, W. Oxysterols and atherosclerosis. **Atherosclerosis.**, v.142, p.1–28, 1999.
6. CABRERA, T. et al. Variación de lípidos y ácidos grasos en camarones marinos consumidos en Venezuela. **Arch Latinoam Nutr.**, v.55, n.2, p.194-200, 2005.
7. CHEW, B.P. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-caroteno, cantaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. **Anticancer Res.**, v.19, p.1849-1853, 1999.
8. CHIEN, Y.H., JENG, S.C. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. **Aquaculture**, v.102, p.333-346, 1992.
9. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION (FAO). **The State of World Fisheries and aquaculture, 2008**. Roma: Fisheries and Aquaculture Department, 2009.
10. FREYGANG, J. **Determinação do colesterol e ácidos graxos em camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados na região de Santa Catarina e efeito do seu consumo no perfil lipídico de ratos (*Rattus norvegicus*)**. 2007. 68f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007. Disponível em: <http://www.bu.ufsc.br>. Acesso em 11 maio 2009.

11. GUERIN, M., HUNTLEY, M.E., OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends Biotechnol.**, v.21, n.5, p.210-216, 2003.
12. GOPAKUMAR, K., NAIR, M. R. Lipid composition of five species of Indian prawn. **J Sci. Food Agric.**, v.26, p.319-325, 1975.
13. HUSSEIN, G. et al. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. **J. Nat. Prod.**, v.69, p.443-449, 2006.
14. JACKSON, H., BRAUN, C.L., ERNST, H. The Chemistry of Novel Xanthophyll Carotenoids. **Am. J. Cardiol.**, v.101(sup.), p.50–57, 2008.
15. JOHNSTON, I.A. Muscle and flesh quality traits in wild and farmed Atlantic salmon. **Aquaculture**, v.256, p.323–336, 2006.
16. KUMAR, N., SINGHAL, O.P. Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. **J. Sci. Food Agric.**, v.55, p.497–510, 1991.
17. LATSCHA, T. The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. **Adv. Trop. Aquacult.**, v.9, p.319-325, 1989.
18. LIÑÁN-CABELLO, M.A., PANIAGUA-MICHEL, J., ZENTENO-SAVÍN, T. Carotenoids and retinal levels in captive and wild shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutr.**, v.9, p.383-389, 2003.
19. LYONS, N.M., O'BRIEN, N.M. Modulatory effects of an algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture. **J. Dermatol. Sci.**, v.30, p.73-84, 2002.

20. MANABE, E. et al. Astaxanthin protects mesangial cells from hyperglycemia-induced oxidative signaling. **J. Cell. Bioch.**, v.103, n.6, p.1925-1937, 2008.
21. MCNULTY, H., JACOB, R.F., MASON, R.P. Biologic Activity of Carotenoids Related to Distinct Membrane. Physicochemical Interactions. **Am. J. Cardiol.**, v.101,(10S), p.20-29, 2008.
22. MUSAIGER, A.O., D'SOUZA, R. The effects of different methods of cooking on proximate, mineral and heavy metal composition of fish and shrimps consumed in the Arabian Gulf. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.58, n.1, p.103-109, 2008.
23. O'CONNOR, I., O'BRIEN, N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by β -carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. **J. Dermatol. Sci.**, v.16, n.3, p.226-230, 1998.
24. PALOZZA, P. et al. The protective role of carotenoids against 7-keto-cholesterol formation in solution. **Mol Cell Biochem.**, v.309, p.61–68, 2008.
25. PASHKOW, F.J., WATUMULL, D.G., CAMPBELL, C.L. Astaxanthin: A Novel Potential Treatment for Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. **Am. J. Cardiol.**, v.101, n.10, p.58-68, 2008.
26. PASSOS, R. **Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para aquíicultura.** 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. Disponível em: <http://www.bu.ufsc.br>. Acesso em 11 maio 2009.

27. SETNIKAR, I., SENIN, P., ROVATI, L.C. Antiatherosclerotic efficacy of policosanol, red yeast rice extract and astaxanthin in the rabbit. **Arzneim. Forsch. Drug Res.**, v.55, n.6, p.312-317, 2005.
28. SUPAMATTAYA, K., BOONYARATPALIN, M., BOROWITZKA, L. Effect of a Dunaliella extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v.248, p.207–216, 2005.
29. TAKAHASHI, N.S. et al. Truta salmonada. Processo produtivo em constante aprimoramento no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, v.18, n.105, p.28-33, 2008.
30. TOLASA, S., CAKLI, S., OSTERMEYER, U. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. **Eur. Food Technol.**, v.221, p.787-791, 2005.
31. VERNON-CARTER, E.J., PONCE-PALAFIX, J.T., PEDROZA-ISLAS, R. Pigmentation of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) using Aztec marigold (*Tagetes erecta*) extracts as the carotenoid source. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.46, p.243-246, 1996.
32. YAMADA, S. et al. Pigmentation of Prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids I. Effect of dietary astaxanthin, β -carotene and canthaxanthin on pigmentation. **Aquaculture**, v.87, p.323-330, 1990.
33. YANAR, Y., ÇELİK, M., YANAR, M. Seasonal changes in total carotenoid contents of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* and *Metapenaeus conoceros*) inhabiting the eastern Mediterranean. **Food Chem.**, v.88, p.267-269, 2004.

CAPITULO 4 – EFEITO DA COR DO TANQUE DE CULTIVO SOBRE A PIGMENTAÇÃO DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei*

Este capítulo apresenta o resultado de estudo realizado anteriormente à realização dos demais experimentos. Ao observar os camarões mantidos no Laboratório de Camarões Marinhos, observou-se que camarões mantidos em tanques escuros apresentavam coloração mais escura que aqueles mantidos em tanques claros, mesmo recebendo a mesma alimentação. Como esta modificação de cor poderia interferir nos resultados finais, buscou-se confirmar esta informação e assim adequar às condições experimentais.

Este trabalho foi aceito para publicação como nota científica no Boletim do Instituto de Pesca e está apresentado conforme as normas de publicação do referido periódico.

Effect of background color on shrimp pigmentation

Jane PARISENTI, Luiz Henrique BEIRÃO, José Luiz MOURIÑO, Felipe do Nascimento VIEIRA, Celso Carlos BUGLIONE, Marcelo MARASCHIM.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effect of tank background color on color and total carotenoid content of *Litopenaeus vannamei* shrimp. Five hundred shrimp were grown in two white tanks. Thirty shrimp from each white tank were randomly taken and placed in two black tanks. Ten shrimp of each tank were collected after 30 days of commercial pellet feed. Color analyses showed that color of raw shrimp grown in black tanks was significantly darker (L^* 26.02), green (a^* -2.42) and blue (b^* -2.85) than in white tanks (L^* 33.45, a^* -0.77, b^* 3.88). After cooking, animals from black tanks presented more intense orange color (a^* 21.68, b^* 33.22) than in white tanks (a^* 12.21, b^* 22.37), but presenting similar total carotenoid content. Preliminary studies have reported that background color influences the color of shrimp, but does not interfere significantly in the carotenoid amount accumulated in shrimp.

Keywords: carotenoids; astaxanthin; visual appearance

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da cor do tanque de cultivo sobre a coloração e teor de carotenóides totais de camarões *Litopenaeus vannamei*. Foram cultivados 500 camarões em dois tanques brancos. Aleatoriamente, 30 camarões foram retirados de cada tanque branco e colocados em tanques pretos. Após 30 dias alimentados com ração comercial, foram coletados dez camarões de cada tratamento. As análises de cor mostraram que a cor dos camarões crus cultivados em tanques escuros foi mais escura (L^* 26,02), mais esverdeada (a^* -2,42) e mais azulada (b^* -2,85) que os cultivados em tanques brancos (L^* 33,45, a^* -0,77, b^* 3,88). Após o cozimento, os animais do tanque escuro apresentaram coloração laranja mais intensa (a^* 21,68, b^* 33,22) que os do tanque branco (a^* 12,21, b^* 22,37), mas similar teor de carotenóides totais. Estes resultados preliminares mostram que a coloração do meio de cultivo interfere na cor dos camarões, mas não interfere significativamente no acúmulo de carotenóides nos camarões.

Palavras-Chave: carotenóides; astaxantina; aparência visual

Introduction

Color is one of the most important attributes for shrimp acceptance and market value (LATSCHA, 1989; TUME *et al.*, 2009). The red/orange shrimp color is associated with freshness and product quality (LATSCHA, 1989), being astaxanthin, a carotenoid also found in salmon, the main pigment responsible for this color (BOONYARATPALIN *et al.*, 2001).

Carotenoids are acquired through diet once animals are not capable of carotenoid synthesis. Since the farm environment does not provide such nutrients, adding these compounds to the feed has enhanced the color of farmed shrimp, being astaxanthin the most effective pigment on shrimp color (YAMADA *et al.*, 1990; BOONYARATPALIN *et al.*, 2001; ARREDONDO-FIGUEROA *et al.*, 2003). According to the literature, carotenoid-supplemented feed enhances the color of shrimp, which becomes gray fresh and red/orange when cooked (SUPAMATTAYA *et al.*, 2005; PASSOS, 2006).

Carotenoids serve several functions as well as pigmentation: they are a source of pro-vitamin A (DALL, 1995; LIÑÁN-CABELLO *et al.*, 2003), increase survival rate and weight gain (ARREDONDO-FIGUEROA *et al.*, 2003; SUPAMATTAYA *et al.*, 2005), enhance resistance to the white spot syndrome virus (SUPAMATTAYA *et al.*,

2005), maintain ammonia excess and resistance to stress (CHIEN *et al.*, 2003), improve hepatopancreatic function (PAN *et al.* 2003), protect cholesterol and polyunsaturated fatty acids from oxidation (PALOZZA *et al.*, 2008; MCNULTY *et al.*, 2008) and provide antioxidant protection (BRITTON, 1995). However, supplementation time and the amount of carotenoid needed to reach suitable pigmentation have not yet been determined and the cost of supplementation limits its use in commercial feed.

TUME *et al.* (2009) have observed that the color of growing tanks has interfered in shrimp color fed with astaxanthin-supplemented food. Concerning the high costs of astaxanthin supplementation, the objective of this paper is to observe if the tank color may modify shrimp color even without carotenoid supplementation.

Materials and Methods

The experiments were carried out at the marine shrimp laboratory (*Laboratório de Camarões Marinhos – LCM*) at Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), in the city of Florianópolis, southern Brazil, in May 2008.

Litopenaeus vannamei (BOONE, 1931), also known as Pacific white shrimp, adult and weighing $8 \pm 1.2\text{g}$ have been extracted from experimental reserves at LCM/UFSC and used in this experiment.

About 500 shrimp have been kept in two white tanks (black sides and white bottom). 30 shrimp were, randomly, taken from each white tank and placed in two black tanks (black sides and bottom). Water temperature was kept at 28 ± 2 °C and measured twice a day. Seawater was pumped through the aerated tanks. Shrimps have been kept in tanks under continuous simulated daylight system (12h of darkness).

Shrimp were fed with commercial feed three times a day. Carotenoid content in feed was lower than 3ppm as analyzed by UV-visible spectrophotometer as described below.

After 30 days, ten shrimp were removed from each tank and placed into a bucket containing water and ice for 5 minutes until death, being later removed and kept in ice for analyses. The following analyses were carried out using pooled samples of 10 shrimp per tank, being two samples from the dark tanks and two samples for the white tanks.

Shrimp color from each treatment was determined before and after cooking (1min, 100ml water at 100°C) and evaluated right after collection using a Minolta Chromo Meter CR 400 (Osaka, Japan, 2002)

colorimeter calibrated with white reference. Measurements were taken from three parts along the shrimp body (close to head; middle; close to tail) and performed in the colorimetric space L^* (lightness), a^* (redness), b^* (yellowness) (CIELab system), at $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Color measurements in raw and cooked shrimps were carried out with exoskeleton and muscle without exoskeleton, respectively, in order to verify color of shrimps as commercialized in Brazil, whole (when fresh) and peeled (when cooked).

Extraction of carotenoids was determined according to TOLASA *et al.* (2005) with modifications. Cooked shrimp muscle (edible part) and cephalothoraxes were ground and blended for 1 min, separately. 8g of the homogenized mixture have been extracted thrice with 30ml acetone. Each acetone extract was collected in funnel separation. 25ml hexane, 100ml water, and 0.5g of NaCl were added in order to separate water-soluble compounds. Funnels have been kept in dark for 20min and shaken once. Hexane extract was filtered and dehydrated by anhydrous sodium sulfate and poured in a volumetric flask (25ml). Total carotenoid concentration was determined spectrophotometrically by a Hewlett-Packard, HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK) spectrophotometer at 470nm and calculated according to a standard curve ($y = 0.1847x$; $r^2 = 0.9951$) of astaxanthin (Sigma, St. Louis, MO, USA, 98% purity). Analyses were performed in triplicate.

Data was summarized and presented as mean and standard deviation. One-tailed t test was used for mean comparisons with a significance level of 5% using BioEstat 5.0 as statistical treatment software.

Results and Discussion

Shrimp kept in black tanks presented dark gray/blue color, whereas shrimp kept in white tanks showed a lighter gray color. When cooked, shrimp from black tanks presented more intense orange color than those grown in white tanks (Figure 1). Color differences noticed visually have been confirmed by instrumental color measurements, according to Table 1.



Figure 1 Fresh and cooked shrimps grown in white (a) and black (b) tanks

Color of raw shrimp grown in black tanks was significantly darker (L^* lower) and much greener (a^* negative) and bluer (b^* negative) than in white tanks. After cooking, animals from black tanks presented more intense orange color (a^* representing red and b^* representing yellow). Such colors have been observed for muscle as well as for cephalothoraxes samples (Table 1).

Table 1 L* (lightness), a* (redness), and b* (yellowness) values for samples of muscle and cephalothoraxes of raw and cooked shrimp grown in black and white tanks.

	Raw		Cooked	
	Black tank	White tank	Black tank	White tank
Cephalotorax				
L*	26.02 ± 1.58 †	33.45 ± 4.47	55.42 ± 5.12 †	62.83 ± 7.34
a*	-2.42 ± 1.43 †	-0.77 ± 0.81	21.68 ± 2.55 †	12.21 ± 3.93
b*	-2.85 ± 2.33 †	3.88 ± 3.17	33.22 ± 4.70 †	22.37 ± 6.25
Muscle				
L*	33.42 ± 3.14 †	34.42 ± 1.79	65.71 ± 3.66	65.52 ± 6.52
a*	-3.43 ± 0.36 †	-1.62 ± 0.55	15.38 ± 3.91 †	9.52 ± 3.85
b*	-7.55 ± 1.22 †	-0.71 ± 1.76	28.93 ± 7.57 †	15.51 ± 4.69
Mean ± standard deviation. One-tailed <i>t</i> test; †significant difference at confidence level of 5% (n = 2)				

The blue/gray color observed in fresh shrimp is due to the accumulation of crustacyanin, a protein-astaxanthin complex that becomes orange with complex dissociation. This dissociation may occur because of heat (cooking) or the addition of substances such as acetone (MURIANA *et al.*, 1993; VELU *et al.*, 2003).

This color change caused by formation/dissociation of the complex is due to the bathochromic effect (a change in the wavelength absorbed by compounds). Free astaxanthin absorbs light at 470-472nm (yellow, orange and red) and with the formation of the astaxanthin-protein complex, absorption at 632nm (green, blue or purple) is observed (WEESIE *et al.*, 1995; CIANCI *et al.*, 2002).

This effect is biologically important once changing in shell color is a camouflage mechanism essential for defense strategies against predators (LATSCHA, 1989).

Regarding consumer preference, observed through subjective analysis, orange color after cooking is preferred for white shrimp (LATSCHA, 1989; BOONYARATPALIN *et al.*, 2001; TUME *et al.*, 2009). However, studies reporting color preferences for raw shrimp have not been found. These studies are important once the majority of shrimp is commercialized fresh.

Significant differences have not been observed as regards to total carotenoid content between shrimp grown in white and black tanks, for either cephalothoraxes (p = 0.3678) or muscle (p= 0.0930) (Table 2).

Table 2 Carotenoid content (mg/100g) in muscle and cephalothoraxes of shrimp kept in black and white tanks

Total carotenoids	Black tank	White tank
Cephalotorax	1.81 ± 0.13	1.62 ± 0.23
Muscle	0.67 ± 0.20	0.53 ± 0.10

Mean ± standard deviation. One-tailed *t* test; †significant difference at confidence level of 5% (n = 2)

Such results indicate that the background tank color changes shrimp color but does not interfere significantly in the carotenoid amount accumulated in shrimp.

Results of the present study are in tune with TUME *et al.* (2009) who reported that shrimp fed with supplemented feed (40ppm astaxanthin) during 28 days and grown in black or white tanks presented the same color differences as those presented in this study.

TUME *et al.* (2009) also observed a similarity in the amount of astaxanthin (major carotenoid) present in shrimp grown in black and white tanks, being the color differences observed using subjective assessment due to the location of pigmentation. For shrimp grown in black tanks, astaxanthin was spread in the epidermis while for shrimp grown in white tanks it was densely packed in chromatophores, i.e., the difference relies on the way these compounds, in particular astaxanthin, are deposited in these crustaceans and not on the accumulated amount.

According to the literature, feed supplemented with carotenoids such as β-carotene and astaxanthin has been recommended to grow more pigmented shrimp with higher carotenoid content (YAMADA *et al.*, 1990; BOONYARATPALIN *et al.*, 2001; ARREDONDO-FIGUEROA *et al.*, 2003; SUPAMATTAYA *et al.*, 2005; PASSOS, 2006). Other studies also demonstrate that the substrate light may cause the accumulation of astaxanthin in shrimp in order to protect against damage caused by luminosity excess, although it did not concerned shrimp color (YOU *et al.*, 2006). Nevertheless, studies reporting the relation between color tank, carotenoid content, and shrimp pigmentation are scarce. Therefore, these studies show that there are several ways to change color and/or astaxanthin content in shrimp, which assures this field as a very promising field of research.

The present work is the first to study the effect of background color tank on color of shrimp not fed with carotenoid-supplemented feed. The commercial feed used contains a small amount of carotenoid naturally present in the raw material formulation, which could have been

converted in astaxanthin by shrimp, as demonstrated by other authors (BOONYARATPALIN *et al.*, 2001; SUPAMATTAYA *et al.*, 2005; PONCE-PALAFIX *et al.*, 2006), and accumulated differently according to the color tank (TUME *et al.*, 2009). It suggests that even without supplemented feed, it may be possible to change shrimp color through altering of the tank color.

It is important to say that, although it has been demonstrated that the color tank changes shrimp color, it does not change the amount of accumulated carotenoids. Therefore, the alterations in tank color may be a lower-cost alternative to intensify shrimp color that does not bring the benefits of shrimp development through carotenoid-supplemented diet (LIÑÁN-CABELLO *et al.*, 2003; ARREDONDO-FIGUEROA *et al.*, 2003; SUPAMATTAYA *et al.*, 2005), as well as the nutritional qualities and benefits to consumer health that these nutrients ensure (GUERIN *et al.*, 2003; HUSSEIN *et al.*, 2006; PALOZZA *et al.*, 2008).

Studies with larger number of samples and sensorial analyses are necessary in order to observe the acceptance of these shrimp as well as discussing the use of black tanks to obtain intensely-colored shrimp.

This preliminary study has reported that the background tank color influences the color of shrimp, but does not interfere significantly in the carotenoid amount accumulated in shrimp.

Acknowledgements The authors thank Prof. Vera L. C. G. Tramonte, Prof. Roseane Fett, Eliseu Rodrigues and Luciano V. Gonzaga; all employees and students from Laboratório de Camarões Marinhos (UFSC); CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for fellowship.

References

ARREDONDO-FIGUEROA, J.L.; PEDROZA-ISLAS, R.; PONCE-PALAFIX, J.T.; VERNON-CARTER, E.J. 2003 Pigmentation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chili (*Capsicum annuum*) in comparison to astaxanthin. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Iztapalapa, 2: 101-108.

BOONYARATPALIN, M.; THONGROD, S.; SUPAMATTAYA, K.; BRITTON, G.; SCHLIPALIUS, L.E. 2001 Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*, Oxford, 32: 182S-190S.

BRITTON, G. 1995 Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Bethesda, 9: 1551-1558.

CIANCI, M.; RIZKALLAH, P. J.; OLCZAK, A.; RAFTERY, J.; CHAYEN, N.E.; ZAGALSKY, P.F.; HELLIWELL, J.R. 2002 The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: β -Crustacyanin at 3.2-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, 99: 9795-9800.

CHIEN, Y. H.; PAN, C.H.; HUNTER, B. 2003 The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture*, Amsterdam, 216: 177–191.

DALL, W. 1995 Carotenoids versus retinoids (vitamin A) as essential growth factors in penaeid prawns (*Penaeus semisulcatus*). *Marine Biology*, Heidelberg, 124: 209-213.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M.E.; OLAIZOLA, M. 2003 *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnology*, Oxford, 21(5): 210-216.

HUSSEIN, G. ; SANKAWA, U. ; GOTO, H. ; MATSUMOTO, K. ; WATANABE, H. 2006 Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*, Columbus, 69: 443-449.

LATSCHA, T. 1989 The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. *Advances in Tropical Aquaculture, Advances in Tropical Aquaculture*, Tahiti, 9: 319-325.

LIÑÁN-CABELLO, M.A.; PANIAGUA-MICHEL, J.; ZENTENO-SAVÍN, T. 2003 Carotenoids and retinal levels in captive and wild shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, Oxford, 9: 383-389.

MCNULTY, H.; JACOB, R.F.; MASON, R.P. (2008) Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane. Physicochemical Interactions. *American Journal of Cardiology*, New York, 101(10S): 20-29.

MURIANA, F. J.G.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; GALLARDO-GUERRERO, M.L.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I. 1993 A study of the lipids and carotenoprotein in the prawn, *Penaeus japonicus*. *Journal of Biochemistry*, Tokyo, 114(2): 223-229.

PALOZZA, P.; BARONE, E.; MANCUSO, C.; PICCI, N. 2008 The protective role of carotenoids against 7-keto-cholesterol formation in solution. *Molecular and Cellular Biochemistry*, The Hague, 309: 61–68.

PAN, C.H.; CHEIN, Y.H.; HUNTER, B. 2003 The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Christchurch, 297: 107–118.

PASSOS, R. 2006 *Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para aquíicultura*. PhD dissertation, Federal University of Santa Catarina. Available at: <<http://www.bu.ufsc.br>> Cited: 11 may 2009.

PONCE-PALAFOX, J.T.; ARREDONDO-FIGUEROA J.L.; VERNON-CARTER, E.J. 2006 Carotenoids from plants used in the diets for the culture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Iztapalapa, 5: 157-165.

SUPAMATTAYA, K.; KIRIRATNIKOMA, S.; BOONYARATPALIN, M.; BOROWITZKA, L. 2005 Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, Amsterdam, 248: 207– 216.

TOLASA, S.; CAKLI, S.; OSTERMEYER, U. 2005 Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. *European Food Research and Technology*, Germany, 221:787-791.

TUME, R.K.; SIKES, A.L.; TABRETT, S.; SMITH, D.M. 2009 Effect of background color on the distribution of astaxanthin in black tiger prawn (*Penaeus monodon*): Effective method for improvement of cooked color. *Aquaculture*, Amsterdam, 296: 129–135.

VELU, C.S.; CZECZUGA, B.; MUNUSWAMY, N. 2003 Carotenoprotein complexes in entomostracan crustaceans (*Streptocephalus dichotomus* and *Moina micrura*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, Amsterdam, 135: 35-42.

WEESIE, R.J.; ASKIN, D.; JANSEN, F.J.H.M.; GROOT, H.J.M. DE; LUGTENBURG, J.; BRITTON, G. 1995 Protein-chromophore interactions in α -crustacyanin, the major blue carotenoprotein from the carapace of the lobster, *Homarus gammarus* a study by ^{13}C magic angle spinning NMR. *FEBS Letters*, Heidelberg, 362: 34-38.

YAMADA, S.; TANAKA, Y.; SAMESHIMA, M.; ITO, Y. 1990
Pigmentation of Prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids I. Effect
of dietary astaxanthin, β -carotene and canthaxanthin on pigmentation.
Aquaculture, Amsterdam, 87: 323-330.

YOU, K.; YANG, H.; LIU, Y. LIU, S.; ZHOU, Y.; ZHANG, T. 2006
Effects of different light sources and illumination methods on growth
and body color of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*,
Amsterdam, 252:557-565.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A adição de lecitina de soja parece não influenciar no aproveitamento dos carotenóides de *H. pluvialis* adicionados na ração, nas condições descritas neste estudo.

- A suplementação com 60 ppm de carotenóides de *H. pluvialis* por 14 ou 28 dias aumenta o teor de carotenóides totais e astaxantina nos camarões e melhora a aceitabilidade dos camarões cozidos.

- A coloração do tanque de cultivo influencia na coloração dos camarões, mas não interfere na quantidade de carotenóides acumulados.

- Os camarões cozidos mais pigmentados são preferidos pelos consumidores e seu consumo favorece a ingestão de carotenóides, principalmente a astaxantina.

- Os camarões crus de coloração mais clara e menor teor de carotenóides e astaxantina são preferidos pelos consumidores demonstrando que as ações de suplementação para pigmentar os camarões devem ser acompanhadas de estratégias de marketing para informar os consumidores e melhorar a aceitação ou estes devem ser destinados a venda já cozidos, onde apresentaram elevada preferência.

- Com relação à coloração dos camarões, além do método apresentado, outros estudos podem ser desenvolvidos utilizando fontes alternativas de carotenóides como resíduos da indústria de alimentos e também pela modificação da cor do meio de cultivo.

- Sugere-se também investigar e comparar os mecanismos de fixação da astaxantina no salmão e camarão e assim propor métodos mais eficientes de suplementação.

- Outra linha de pesquisa importante para indústria de alimentos refere-se à possibilidade de aumento do valor nutricional dos camarões. Propõe-se verificar se a suplementação da ração com astaxantina exerce proteção antioxidante sobre o colesterol e lipídios presentes nos camarões.